

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1897

THÈSE

N° 62

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le jeudi 2 décembre 1897, à 1 heure

Par PAUL PORTIER

Né à Bar-sur-Seine, le 22 mai 1866

Licencié ès-sciences naturelles

Préparateur de physiologie à la Sorbonne

(Travail du laboratoire de physiologie de la Sorbonne)

LES OXYDASES

DANS LA SÉRIE ANIMALE

LEUR RÔLE PHYSIOLOGIQUE

Président : M. BLANCHARD, professeur.

Juges : MM. DEBOVE, professeur.

GLEY,

ROGER,

} *agregés.*

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1897

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

63

Année 1897

THÈSE

No

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le jeudi 2 décembre 1897, à 1 heure

Par PAUL PORTIER

Né à Bar-sur-Seine, le 22 mai 1866

Licencié ès-sciences naturelles

Préparateur de physiologie à la Sorbonne

(Travail du laboratoire de physiologie de la Sorbonne)

LES OXYDASES

DANS LA SÉRIE ANIMALE

LEUR RÔLE PHYSIOLOGIQUE

Président : M. BLANCHARD, professeur.

Juges : MM. DEBOVE, professeur.

GLEY,

ROGER,

} *agregés.*



PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1897

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen..... M. BROUARDEL.
Professeurs..... MM.

Anatomie.....	FARABEUF.
Physiologie.....	Ch. RICHET.
Physique médicale.....	GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale.....	GAUTIER.
Histoire naturelle médicale.....	N...
Pathologie et thérapeutique générales.....	BOUCHARD.
Pathologie médicale.....	{ DEBOVE.
	{ HUTINEL.
Pathologie chirurgicale.....	LANNELONGUE.
Anatomie pathologique	CORNIL.
Histologie.....	MATHIAS DUVAL.
Opérations et appareils.....	TERRIER.
Pharmacologie et matière médicale.....	POUCHET.
Thérapeutique.....	LANDOUZY.
Hygiène.....	PROUST.
Médecine légale.....	BROUARDEL.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	LABOULBENE.
Pathologie comparée et expérimentale.....	CHANTEMESSE.
Clinique médicale.....	{ POTAIN.
	{ JACCOUD.
	{ HAYEM.
Clinique des maladies des enfants.....	DIEULAFOY.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	GRANCHER.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale.....	FOURNIER.
Clinique des maladies nerveuses.....	JOFFROY.
	RAYMOND.
Clinique chirurgicale.....	{ DUPLAY.
	{ LE DENTU.
	{ TILLAUX.
Clinique ophtalmologique.....	BERGER.
Clinique des voies urinaires.....	PANAS.
Clinique d'accouchements.....	{ GUYON.
	{ TARNIER.
	{ PINARD.

Agrégés en exercice

MM.	MM.	MM.	MM.
ACHARD.	GAUCHER.	MARIE.	SEBILEAU.
ALBARRAN.	GILBERT.	MENETRIER.	THIÉRY.
ANDRÉ.	GILLES DE LA TOURETTE.	NÉLATON.	THOINOT.
BAR.	GLEY.	NETTER.	TUFFIER.
BONNAIRE.	HARTMANN.	POIRIER, Chef de tra-	VARNIER.
BROCA.	HEIM.	vaux anatomiques.	WALTHER.
CHARRIN.	LEJARS.	RETTERER.	WEISS.
CHASSEVANT.	LETULLE.	RICARD.	WIDAL.
Pierre DELBET.	MARFAN.	ROGER.	WURTZ.

Secrétaire de la Faculté : M. PUFIN.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON MAITRE

M. A. DASTRE

PROFESSEUR DE PHYSIOLOGIE A LA SORBONNE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR R. BLANCHARD

A M. LE DOCTEUR REGNARD

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR A L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE

CHAPITRE PREMIER

Introduction.

Lavoisier en 1777, montre que de véritables combustions s'accomplissent au sein de l'organisme.

Il y voit à juste titre la source de la chaleur animale ; mais il se trompe sur le siège de ces combustions qu'il place dans le poumon.

D'autres expérimentateurs Magnus 1837, par l'analyse des gaz du sang, Gay-Lussac, Magendie, Claude Bernard, par des expériences de plus en plus précises localisent le siège des combustions au niveau des capillaires des tissus.

La combustion se fait-elle dans le sang du capillaire ou à l'intérieur de la cellule animale elle-même ? Bien que l'accord à ce sujet ne soit pas complètement fait entre les physiologistes, il semble bien que les phénomènes de combustion se passent à l'intérieur même de la cellule.

Nous sommes donc à peu près fixés sur le siège des combustions, sources principales, mais non uniques, comme l'a montré M. Gautier, de l'énergie qui produit le fonctionnement des divers organes de l'organisme animal et la quantité de chaleur nécessaire à l'entretien de sa température.

Mais quel est le mécanisme de ces oxydations ? l'oxy-

gène mis en réserve, puis véhiculé par le globule rouge, amené ainsi jusqu'au contact de l'élément anatomique vait-il s'unir directement au glucose, aux graisses, à certains albuminoïdes et produire le dégagement d'énergie, source de tous les phénomènes vitaux ?

Il semble qu'il en soit ainsi, mais lorsque l'on eut analysé de près les diverses phases du phénomène de la respiration intime, on vit qu'un anneau manquait à la chaîne, qu'un point restait obscur.

En effet :

1° Les principes chimiques dont l'oxydation produit l'énergie dans l'organisme ne sont pas oxydés par l'oxygène atmosphérique lorsqu'on les place *in vitro* dans les conditions de température, de réaction, d'oxygénation qu'ils trouvent dans l'organisme ;

2° Des expériences directes ont montré à Hoppe-Seyler, que l'oxygène qui quitte le globule rouge ne possède pas de propriétés plus oxydantes que l'oxygène moléculaire ordinaire (1).

Dès lors de nombreux chimistes et physiologistes s'attachèrent à résoudre ce problème.

Schœnbein venait de découvrir l'ozone, il pensa que l'oxygène existait à cet état dans le sang, ce qui eut expliqué une partie des phénomènes d'oxydation qui s'y accomplissent.

Mais, il n'en est rien. Si on agite du sang oxygéné avec de la teinture de résine de gaïac, la coloration bleue caractéristique de la présence de l'ozone ne se produit pas.

(1) HOPPE-SEYLER, *Med. chem. Untersuchungen*, t. I, p. 133, 1866.

Pour que la réaction se produise, il faut ajouter au mélange de l'essence de térébenthine fraîchement préparée. L'essence s'empare de l'oxygène de l'oxyhémoglobine et le cède ensuite à la résine de gaïac après avoir accru son pouvoir oxydant.

D'ailleurs, l'ozone mis en présence des matières organiques est instantanément décomposé. Son troisième atome auquel il doit son pouvoir oxydant se porte sur la matière organique pour l'oxyder et il se transforme lui-même en oxygène moléculaire. De sorte que, comme le fait remarquer Bunge (1), nous pourrions introduire de grandes quantités d'ozone dans le sang sans jamais pouvoir en extraire une molécule.

L'hypothèse de Schœnbein doit donc être abandonnée.

On pensa alors à la présence possible dans le sang et les tissus de substances réductrices qui, s'emparant d'un atome de la molécule d'oxygène, mettrait le second en liberté et produirait ainsi de l'oxygène naissant dont les propriétés oxydantes sont plus énergiques même que celles de l'ozone. Cet oxygène naissant pourrait alors oxyder des substances inattaquables par l'oxygène ordinaire.

De telles substances réductrices existent en effet dans le sang et les tissus. Elles ont fait le sujet de travaux récents de M. Abelous (2) et de MM. Bohr et Henriques (3).

(1) BUNGE, *Chimie biologique*, 2^e éd., traduction française, p. 241.

(2) ABELOUS, Dosage des matières extractives réductrices dans les organes. *Archives de physiologie*, 1897, p. 1.

(3) BOHR et HENRIQUES, Recherches sur le lieu de la consommation de

Il est possible que ces substances aient une action dans les phénomènes d'oxydation de l'organisme, mais aucune expérience directe n'est venue le prouver.

Nous arrivons enfin aux hypothèses de Moritz Traube, hypothèses aussi nombreuses qu'ingénieuses, mais qui ne furent pas appuyées d'expériences convaincantes par leur auteur.

Traube (1) admet l'existence hypothétique de transmetteurs d'oxygène (*Sauerstoff-Ueberträger*) qui se combineraient faiblement à l'oxygène et le céderaient ensuite aux corps sur lesquels l'oxydation doit porter les *Sauerstoffnehmer* ; un nouveau corps interviendrait à ce moment, l'excitateur de l'oxygène, le *Sauerstofferreger* qui se confond avec le ferment oxydant.

Schmiedeberg (2) étudie l'oxydation de l'alcool benzilique et de l'aldéhyde salicylique sous l'influence du sang oxygéné et des tissus. Il arrive à des conclusions qui sont confirmées par Jaquet (3), à savoir que les deux corps soumis à l'expérience sont peu ou pas oxydés par le sang seul (artérialisé pendant 17 à 48 heures à 10-30°), tandis qu'il se produit de notables proportions d'acide salicylique lorsque le sang circule à travers un organe (poumon par exemple).

L'oxydation qui se produit paraît bien être due à la présence d'un ferment soluble, car elle se produit même

l'oxygène et de la formation de l'acide carbonique dans l'organisme. *Ibidem*, p. 459.

(1) MORITZ TRAUBE, *Théorie der Fermentwirkungen*, Berlin, 1858, et plusieurs mémoires dans *Ber. d. d. chem. Gesellschaft*.

(2) SCHMIEDEBERG, *Archiv. für exper. Pathol. u. Pharm.*, 1876, t. VI, p. 233 et 1881, t. XIV, p. 288 et 379.

(3) JAQUET, *Compte rendu Soc. biol.*, 18 mars 1892; *Archiv. für exper. Path. in Pharm.*, 1892, t. XXIX, p. 386.

lorsque les cellules de l'organe dans lequel on établit la circulation ont été tuées par la congélation ou par l'action de l'alcool ou de l'acide phénique.

Salkowsky (1) reprend des expériences analogues à celles de Schmiedeberg et de Jaquet qu'il avait commencées en 1882 et arrive à des conclusions un peu différentes de celles de ces auteurs. Pour lui, le sang lui-même pulvérisé à la température de 40 à 42° a la propriété d'oxyder l'aldéhyde salicylique et de le transformer en acide salicylique. Il attribue dans ce phénomène un rôle important aux globules et à l'hémoglobine.

Abelous et Biarnès (2) reprennent les expériences de Schmiedeberg, Salkowsky et Jaquet et arrivent aux conclusions suivantes :

Le sang artérialisé (Veau, Cheval, Chien), est capable de transformer l'aldéhyde salicylique en acide salicylique à condition que la température soit assez élevée (40°).

Le sang des différents animaux se comporte d'une façon différente au point de vue de son pouvoir oxydant.

L'oxydation produite paraît être sous la dépendance d'un ferment soluble et non sous celle des éléments anatomiques, car elle se produit même lorsqu'on a fluoré le sang à 2 0/0 au sortir du vaisseau.

Les organes (poumons, reins) ont un pouvoir oxydant plus considérable encore que celui du sang vis-à-vis de l'aldéhyde salicylique.

(1) SALKOWSKY, *Centralblatt für medicin. Wissenschaft*, 1892, t. XXX, p. 849, *Zeitsch. für physiol. Chem.*, 1882, t. VII, p. 115.

(2) ABELOUS et BIARNÈS, Sur le pouvoir oxydant du sang. *Archives de Physiol.*, 1894, p. 591.

Dans plusieurs autres mémoires (1) les mêmes auteurs revenant sur la même étude établissent les différences de pouvoir oxydant des différents organes d'un même animal, l'optimum de température du ferment qui oxyde l'aldéhyde salicylique (60°) ; l'absorption d'oxygène qui accompagne cette oxydation.

Les expériences de Jaquet, celles plus précises d'Abelous et Biarnès plaident en faveur de l'existence d'un ferment oxydant qui existerait dans le sang et surtout dans les tissus. Mais les auteurs précédents ne sont pas parvenus à isoler ce ferment, ils ne disent rien de la substance sur laquelle il aurait le pouvoir d'agir, non plus *in vitro*, mais dans l'organisme ; enfin et surtout, comme le fait remarquer M. G. Bertrand (2) : « Les quantités de substances oxydées dans ces expériences ont été si minimes même dans les meilleures conditions, qu'elles ne permettent pas de trancher définitivement entre l'hypothèse de la simple réduction d'un corps suroxydé préexistant en quantité finie et très faible dans les liquides en expérience, ou celle d'une véritable intervention diastasique. »

C'est l'auteur dont nous venons citer les paroles, M. G. Bertrand qui devait transformer en certitude les présomptions de ses prédécesseurs et, par des expériences irréprochables, établir d'une façon très ferme l'existence

(1) ABELOUS et BIARNÈS, Sur le pouvoir oxydant du sang et des organes. *Archives de physiologie*, 1895, p. 195. Recherches sur le mécanisme des oxydations organiques. *Archives de physiologie*, 1895, p. 239. Nouvelles expériences sur le mécanisme des oxydations organiques. *Comp. Rend. Soc. biol.*, 31 janvier 1896, p. 1894.

(2) G. BERTRAND, La laque et la laccase. *Archives de physiologie*, 1896, p. 23.

d'une diastase oxydante, et par conséquent d'une nouvelle classe de ferments solubles.

C'est chez les végétaux que M. G. Bertrand découvre l'existence d'un tel ferment (1).

Lorsqu'on incise le tronc de certains arbres de la famille des Anacardiacees, il s'écoule un liquide laiteux qui, par son séjour à l'air ne tarde pas à prendre une couleur grisâtre puis noire. Ce noircissement est dû à l'oxydation du laccol qui est probablement d'après M. G. Bertrand, un corps voisin comme constitution chimique du pyrogallol et de l'hydroquinone et qui appartiendrait par conséquent au groupe de polyphénols.

Ce latex étendu en couche mince constitue la laque de la Chine et du Japon.

Si on délaye ce latex dans l'alcool à 90°, le laccol est dissous ; quand on filtre il passe donc à travers le filtre pendant qu'un précipité blanchâtre est retenu. Ce précipité purifié par plusieurs redissolutions et reprécipitations successives est enfin desséché dans le vide.

On obtient ainsi une substance qui se présente en fragments blanchâtres solubles dans l'eau, insoluble dans l'alcool.

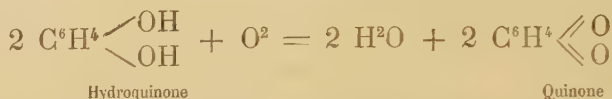
M. Bertrand a étudié le mode d'action de cette substance sur certains phénols polyatomiques.

Si par exemple on met 0 gr. 01 de cette substance dans 100 centimètres cubes d'une solution d'hydroquinone à 1 0/0, on voit la solution se colorer en rouge, en même temps, on perçoit l'odeur caractéristique de la quinone et

(1) G. BERTRAND, Sur la recherche et la présence de la laccase chez les végétaux. *Compt. rendus Acad. des scienc.*, 1893, CXXI, p. 166.

au fond du tube ne tardent pas à se déposer des lamelles vertes de quinhhydrone.

L'équation suivante montre ce qui s'est passé dans cette réaction.



On voit donc que la quinone ne diffère de l'hydroquinone que par la simple élimination des deux hydrogènes phénoliques. Il s'est donc opéré une oxydation *sans dédoublement*.

Si on opère en vase clos, on peut en même temps constater une absorption d'oxygène et une formation d'acide carbonique. C'est ainsi qu'avec la quantité d'hydroquinone et de ferment oxydant indiqué, Bertrand a constaté qu'en présence d'un volume d'air de 220 cc. 1, il y avait eu 32 centimètres cubes d'oxygène absorbé en quatre heures.

Bertrand a donné à ce ferment le nom de « laccase » parce qu'il l'avait extrait pour la première fois du latex de l'arbre à laque.

La découverte de Bertrand présentait un grand intérêt pour les physiologistes, aussi elle suscita de nombreux travaux. Nous ne les examinerons pas pour le moment. On en trouvera la liste à l'index bibliographique à la fin de ce travail.

Les résultats qui nous intéressent seront discutés à leur place dans le cours du travail. Disons seulement que Bertrand dans de nombreuses notes à l'Académie des sciences et à la Société de biologie dont plusieurs en collaboration avec M. Bourquelot, a établi l'existence de la laccase

dans les organes jeunes de la plupart des plantes vertes ainsi que dans un grand nombre de champignons.

Il a de plus montré qu'il devait y avoir non pas un seul, mais *des* ferments oxydants. Il a donné le nom général d'oxydases aux corps qui composent cette nouvelle classe de ferments et il a décrit en particulier chez certains champignons (1) (*Russula cyanoxantha*.. *R. foetens*) une oxydase qui agit sur la tyrosine (qui existe en abondance dans ces champignons) et la colore au noir par oxydation. Il a donné le nom de tyrosinase à ce nouveau ferment distinct de la laccase et de l'oxydase des plantes vertes puisque ces derniers ferments n'agissent pas sur la tyrosine.

MM. Abelous et Biarnès (2) ont mis en évidence une oxydase dans le sang et les organes des crustacés et même dans le sang et certains organes des mammifères.

Enfin M. Pieri (3) et moi nous avons signalé ce même ferment chez certains invertébrés marins.

(1) BERTRAND, Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant d'origine végétale. *Compt. rend. Acad. scienc.*, 1895, p. 4215.

Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Compt. rend. Acad. scienc.*, 1896, p. 463.

(2) ABELOUS et BIARNÈS, Oxydase des crustacés. *Compt. rend. Soc. biol.*, 6 mars 1897, p. 249. Sur l'existence d'une oxydase chez les mammifères. *Compt. rend. Soc. biol.*, 20 mars 1897, p. 283. Nouvelles expériences. *Id.*, 22 mai 1897, p. 493.

(3) PIERI et PORTIER, Présence d'une oxydase dans certains tissus des mollusques acéphales. *Archives de physiologie*, janvier 1897, p. 60.

CHAPITRE II

Constitution chimique des oxydases.

C'est encore à M. Bertrand que nous devons de très intéressantes expériences à ce sujet.

En analysant la laccase de l'Annam, M. Bertrand avait été frappé de sa richesse en manganèse (2, 5 0/0 du poids des cendres).

Rapprochant ce fait des propriétés oxydantes des sels manganeux, M. Bertrand parvint à prouver que le manganèse a certainement une grande part dans la puissance oxydante du ferment.

En effet, l'oxydase extraite de certaines plantes, la luzerne par exemple, est très pauvre en manganèse (moins de 1/5000) ; son pouvoir oxydant est également très faible, et, fait très remarquable, il augmente dans des proportions considérables lorsqu'on additionne le ferment d'une quantité très faible d'un sel de manganèse, quantité qui, à elle seule, serait tout à fait insuffisante pour produire le phénomène observé.

C'est ainsi que dans une expérience, on a les chiffres suivants pour l'absorption de l'oxygène :

- 1° Avec le manganèse seul (expérience témoin), 0 cc. 3.
- 2° Avec la laccase (de la luzerne) seule, 0 cc. 2.

(1) G. BERTRAND, Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquées par la laccase. *Compt. rend. Acad. scienc.*, 1897, CXXXIV, p. 1032.

3^e Avec la même laccase additionnée de manganèse, 6 cc. 3.

Cette importance du manganèse dans les phénomènes d'oxydation rapprochée de la présence nécessaire du calcium pour l'activité du labferment et du fibrinferment (Arthus et Pagès) ainsi que de la pectase (Bertrand et Mallèvre) jette un jour tout nouveau sur la façon dont on doit comprendre la constitution chimique des ferments solubles qui résulteraient de l'union d'une matière organique très altérable avec une matière minérale.

Nous venons de voir quel rôle important jouait le manganèse dans la constitution des oxydases végétales. Entre-t-il aussi dans la composition des oxydases animales ?

Nous n'avons pas encore fait d'expériences directes de dosage de manganèse dans les tissus qui nous ont donné les résultats les plus nets pour l'extraction des oxydases animales. Mais nous nous sommes assuré que des macérations dans l'eau chloroformée de branchies d'*Artemis exoleta* présentaient un pouvoir oxydant beaucoup plus énergique lorsqu'on y ajoutait une petite quantité d'un sel de manganèse (sulfate). La même quantité du sel de manganèse ajoutée au liquide de macération préalablement bouilli ne donnait qu'une liqueur à peu près indifférente vis-à-vis des réactifs des ferments oxydants.

Ces résultats sont donc d'accord avec ceux que Bertrand a obtenus en opérant sur l'oxydase extraite de la luzerne et ils semblent bien indiquer que le manganèse fait partie de la molécule des oxydases animales (1).

(1) Nous avons recueilli différents liquides et tissus d'invertébrés riches en oxydase. Nous nous proposons d'y doser prochainement le manganèse par la méthode de Hoppe-Seyler.

CHAPITRE III

Propriétés des oxydases.

Ce sont celles qui sont communes à tous les ferments solubles : solubilité dans l'eau ; précipitation par l'alcool. Destruction par la chaleur.

Comme les autres ferments solubles les oxydases se laissent aussi extraire des cellules qui les contiennent par la glycérine. Les solutions glycinées ainsi obtenues conservent même leurs propriétés beaucoup plus longtemps que les solutions aqueuses (1).

Mais la façon la plus pratique d'extraire le ferment oxydant des organes qui le contiennent, celle que nous avons presque toujours employée c'est la macération dans l'eau chloroformée.

Les ferments oxydants dialysent-ils ? — On sait que l'accord entre les physiologistes n'est pas encore entièrement fait au sujet de la dialyse des ferments solubles. Certains ferments comme l'invertine paraissent dialyser faiblement tandis que la plupart des autres ne dialysent pas.

Comme nous le verrons plus loin, il y avait intérêt à savoir si les oxydases dialysent, car c'est le seul moyen qui nous permettra de les séparer de substances chimiques

(1) EM. BOURQUELOT, Sur la durée de l'activité des ferments oxydants des champignons en solution dans la glycérine. *Compt. rend. Soc. biol.*, 8 mai 1897, p. 454.

voisines par leurs actions oxydantes mais qui ne doivent cependant pas être rangées dans la catégorie des ferments oxydants.

Expériences. — Le 1^{er} août on met dans un dialyseur (1) 20 centimètres cubes d'une solution de laccase à 1 0/0 (2). Le dialyseur plonge dans un vase contenant aussi 20 centimètres cubes d'eau distillée. On met le tout à la glacière.

Le 2, — on ne peut déceler aucune trace d'oxydase dans l'eau extérieure au dialyseur.

Le 5, — le ferment n'a pas encore dialysé.

La solution de laccase placée à l'intérieur du dialyseur a cependant conservé ses propriétés oxydantes. Elle bleuit instantanément et énergiquement avec la teinture de gaïac préparée le jour même. Elle colore aussi fortement en rouge la solution de gaïacol dans l'eau distillée.

On ajoute alors quelques cristaux du sulfate d'ammoniaque dans la solution de ferment, à l'intérieur du dialyseur.

Le lendemain l'eau extérieure au dialyseur donne un abondant précipité par le chlorure de baryum, le sulfate a donc bien dialysé, mais il est toujours impossible de constater le passage du ferment à travers le dialyseur.

(On constate, d'ailleurs une fois encore que le ferment est resté actif à l'intérieur du dialyseur).

(1) Avant toute expérience, on s'assurait de la bonne qualité du dialyseur en y laissant séjourner pendant quelque temps une solution d'hémoglobine qui ne devait pas dialyser dans le liquide extérieur.

(2) Laccase de l'arbre à laque qui m'a été très obligeamment fournie par M. Bertrand auquel j'adresse mes plus sincères remerciements.

Cette expérience a été recommencée avec des solutions d'oxydases extraites de la fibrine et des branches des acéphales, le résultat a constamment été négatif.

Nous pouvons donc conclure que les oxydases ne dialysent pas.

CHAPITRE IV

Mode d'action des oxydases.

La constitution des oxydases nous permet de concevoir le mode d'action de ces substances dans les oxydations qu'elles provoquent (1).

Les sels manganoux et surtout les sels manganoux organiques à poids moléculaire élevé provoquent l'oxydation énergique des corps sur lesquels l'oxydase a elle-même une action, l'hydroquinone par exemple.

Voici quelle est la marche du phénomène d'après M. Bertrand.

En désignant par R un radical acide divalent quelconque, on peut mettre le sel sous la forme RMn .

Or en présence de l'eau (l'expérience le prouve) on a :



Mais en présence de l'oxygène de l'air MnO est oxydé et on a :



C'est cet atome d'oxygène mis en liberté dans cette réaction qui, possédant les propriétés de l'oxygène naissant, provoque les oxydations qu'on observe.

On voit donc que comme pour le palladium hydrogéné

(1) BERTRAND, Sur l'action oxydante des sels manganoux et sur la constitution chimique des oxydases. *Compt. Rend. Acad. Scienc.*, 14 juin 1897, p. 1355.

de Graham, comme pour l'ozone même c'est l'oxygène atomique qui intervient dans la réaction.

Il est facile de s'expliquer comment le ferment pourra oxyder une quantité presque indéfinie de substance. En effet l'expérience prouve encore qu'on a :



Un nouvel atome devient libre et se fixe sur la substance à oxyder. On est alors revenu au cas représenté dans la première équation.

CHAPITRE V

Séparation des oxydases des autres corps oxydants. — Définition du ferment oxydant.

M. Bourquelot (1) a établi une classification des corps oxydants qu'on peut rencontrer chez les êtres vivants. Voyons s'il est possible de trouver dans tous les cas des caractères qui permettent de différencier les vrais ferments oxydants de ces corps à propriétés oxydantes.

1° *L'ozone*. Schœnbein rapporte qu'en agitant au contact de l'air ozonisé une macération aqueuse d'orge germé, on a un liquide qui donne la réaction caractéristique de l'ozone : le bleuissement avec la teinture de gaïac. Cette propriété disparaît spontanément au bout de quelques heures et instantanément par l'ébullition.

Dans cette expérience, Schœnbein ne spécifie pas que la macération d'orge germé ne donnait pas la réaction avec la teinture de gaïac avant d'avoir été agitée au contact de l'air ozonisé. Or nous avons eu en notre possession de la diastase d'orge germé qui renfermait une quantité (faible à la vérité) de ferment oxydant. Cette diastase dissoute dans l'eau donnait des solutions qui bleussaient nettement et rapidement avec de la teinture de gayac préparée le jour

(1) EM. BOURQUELOT, Remarques sur les matières oxydantes que l'on peut rencontrer chez les êtres vivants. *C. R. Soc. Biol.*, 1^{er} mai 1897, p. 403, et 10 juillet 1897, p. 687.

même (1). Il est donc possible qu'un fait analogue se soit passé dans l'expérience de Schœnbein.

Quoi qu'il en soit, comme nous l'avons fait remarquer (page 7), l'ozone ne saurait exister dans l'organisme ; par conséquent, nous n'avons pas à craindre de confusion à cet égard.

2° Les *ozonides* (Ozontræger) de Schœnbein.

Dans l'hypothèse de cet auteur, ces corps auraient la faculté d'emmagasiner une certaine quantité d'oxygène dont une partie serait à l'état d'ozone. Mis en présence de corps oxydables, ils oxydèrent ces corps en leur cédant leur ozone. La quinone pourrait être rangée parmi ces ozonides.

Il semble à première vue que ces ozonides pourraient être confondus avec les vrais ferments oxydants ; d'autant plus que M. Bourquelot (*loc. cit.*) a découvert le fait que l'ébullition détruit la propriété oxydante de ces corps lorsque la solution contient des albuminoïdes, condition toujours réalisée pour des oxydases extraites des liquides ou des tissus de l'organisme.

Cependant plusieurs caractères permettront toujours de distinguer ces ozonides des vrais ferments oxydants.

Ainsi, leur action ne s'accompagne pas d'une absorption d'oxygène puisqu'elle n'est due qu'à la présence de l'ozone qui, une fois pour toute, est cédé au corps à oxyder.

Enfin la dialyse permet de séparer ces substances des ferments.

(1) Ce qui prouve qu'il n'y avait pas lieu de faire intervenir dans ce cas l'eau oxygénée.

3° Dans une troisième catégorie, M. Bourquelot range les « ferments oxydants véritables » qui auraient comme caractère essentiel d'agir par leur présence au contact de l'oxygène libre pour fixer sur la substance à oxyder une quantité presque indéfinie d'oxygène. Leur action s'accompagne donc toujours d'une absorption notable d'oxygène.

L'indigo, certains sels manganoux et ferreux devraient donc être rangés dans cette catégorie.

Si on considère les corps oxydants seulement au point de vue de leur mode d'action, les corps qui composent cette troisième catégorie ne sauraient être séparés les uns des autres ; mais il n'en va plus de même si on a égard aux propriétés physiques de ces corps.

Dans ce dernier cas, on devra subdiviser les corps de la troisième catégorie en 2 groupes, dont l'un renfermera les corps oxydants incapables de dialyser et détruits par la chaleur. Ces corps seuls devraient être considérés comme les vrais ferments oxydants (1).

4° Dans une quatrième catégorie, M. Bourquelot place les substances qui, mises en présence de l'eau oxygénée la décomposent, et produisent par conséquent de l'oxy-

(1) La découverte des propriétés oxydantes et du mode d'action des sels manganoux ne vient en rien, à notre avis, infirmer l'existence de vrais ferments oxydants. Le ferment soluble est jusqu'à présent pour le physiologiste un agent mystérieux ; par ses très intéressantes études sur le pouvoir oxydant des sels manganoux, pouvoir oxydant qui croît *à mesure qu'augmente le poids moléculaire de l'acide*, M. Bertrand nous montre toutes les transitions qui existent entre une substance purement chimique et un vrai ferment soluble.

(Voir BERTRAND, Sur l'action oxydante des sels manganoux et sur la constitution chimique des oxydases. *Compt. Rend. Acad. Sciences*, CXXIV, p. 1355).

gène naissant qui possède toutes les propriétés de celui qui a été modifié, « excité » par le ferment oxydant (1).

Il n'y a donc pas lieu de tenir compte des corps de cette dernière catégorie. Il faudra seulement retenir ce fait et veiller à ce que les réactifs employés pour reconnaître le ferment oxydant ne contiennent pas d'eau oxygénée (voir au chapitre des réactifs des oxydases).

Définition du ferment oxydant. — En résumé, nous considérons seulement comme ferment oxydant le corps qui présentera les caractères suivants :

1° Pouvoir d'oxydation se manifestant en présence de l'oxygène libre (gazeux ou dissous) ;

2° Action oxydante s'accompagnant d'une absorption notable d'oxygène ;

3° Destruction par la chaleur ;

4° Absence du pouvoir de dialyser.

Ces quatre propriétés réunies sont nécessaires et suffisantes, elles permettent de caractériser les oxydases.

(1) Ces corps qui ont la propriété de décomposer l'eau oxygénée neutre sont, pour la plupart, des ferments solubles, et parmi eux les oxydases (ce qui vient en apparence compliquer la question).

Voir SCHCEBEIN, *Über das Wasserstoff superoxyd als Mittel die fermentartige Beschaffenheit organischer Materien zu erkennen. Journal f. prakt. Chemie*, CXI, 1869, p. 257.

CHAPITRE VI

Réactifs des ferments oxydants.

Ce sont des corps qui, dissous dans l'eau, manifestent les phénomènes d'oxydation qui les atteignent par un changement de coloration.

1° Teinture de résine de gaïac. — On prend de la résine de gaïac au centre d'un morceau de façon que les fragments qu'on emploie n'aient pas été longtemps en contact avec l'air et la lumière. On broie cette résine et on fait une solution saturée dans le chloroforme. Cette solution filtrée est distillée dans le vide. Il reste dans le ballon une substance jaunâtre, visqueuse qu'on achève de dessécher dans le vide sec.

La poudre jaune ainsi obtenue est dissoute dans l'alcool à 65° (1,5 pour 100 d'alcool). On obtient ainsi une teinture très limpide. Si on laisse tomber quelques gouttes de cette teinture dans un peu d'eau, on obtient une émulsion blanche.

Si on additionne une solution d'oxydase de quelques gouttes de cette teinture, on observe presque instantanément une belle coloration bleue.

Cette teinte bleue tient à une oxydation de l'acide gaïaconique.

REMARQUE. — Comme l'a fait remarquer M. Bourque-

lot (1), il importe que cette teinture soit préparée peu de temps avant de s'en servir et qu'elle soit conservée à l'abri de l'oxygène atmosphérique.

Pour peu, en effet, que cette teinture soit conservée quelque temps sans ces précautions, une partie de l'acide gaïaconique s'oxyde spontanément, et il se forme en même temps de l'eau oxygénée. Vient-on alors à ajouter à cette teinture un liquide organique qui ne contient point trace d'oxydase, mais seulement une substance capable de provoquer la décomposition de l'eau oxygénée (ferment soluble), on obtient un bleuissement immédiat dû au dégagement d'oxygène naissant et on croit à la présence d'un ferment oxydant.

Cette remarque s'applique du reste à presque tous les autres réactifs des ferments oxydants.

2° **Gaïacol** (2) en solution dans l'eau distillée.

Cette solution incolore devient d'un jaune rougeâtre lorsqu'on l'additionne d'une solution de ferment oxydant ; il s'y forme en même temps un précipité de la même couleur.

3° **Hydroquinone** en solution à 1 0/0 dans l'eau distillée.

Sous l'influence de l'oxydase, l'hydroquinone est transformée en quinone reconnaissable à sa couleur jaune-brun et à son odeur caractéristique.

Lorsque l'oxydase est très énergique, la quinone réagit

(1) BOURQUELOT, Remarques sur les matières oxydantes que l'on peut rencontrer chez les êtres vivants. *C. R. Soc. Biol.*, 10 juillet 1897.

(2) BOURQUELOT, Sur l'emploi du gaïacol comme réactif des ferments oxydants. *C. R. Soc. Biol.*, 7 novembre 1896, p. 897.

sur l'hydroquinone non encore transformée et il se produit dans le liquide des lamelles vertes de quinhydrone.

4° **Pyrogallol** en solution à 1 p. 60 dans l'eau distillée.

L'addition d'une solution d'oxydase donne lieu à un précipité qui, recueilli, peut se sublimer en aiguilles rouge orangé : la purpurogalline d' Aimé Girard.

5° **Réactif de Reemann et Spitzer** (1). — C'est une solution contenant une molécule de paraphénylène-diamine, une molécule de naphтол et trois molécules de soude.

Cette solution s'emploie très diluée. A l'air libre, elle devient progressivement violette, puis bleue. Ce changement de coloration se produit instantanément lorsqu'on additionne ce mélange d'une petite quantité de solution d'oxydase.

Nous n'avons du reste accordé qu'une médiocre confiance à ce réactif, car additionné d'eau distillée et placé à l'étuve à 40°, il subit rapidement le changement de coloration qui vient d'être décrit.

Ce sont les seuls réactifs que nous ayons employés. D'autres ont été indiqués par M. Bourquelot et aussi par M. Bertrand (2) qui a indiqué la loi chimique suivant laquelle ils sont groupés.

(1) REEMANN et SPITZER, Ueber Oxydationswirkungen thierischer Gewebe. *Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft*, XXVIII, p. 567.

(2) G. BERTRAND, Sur les rapports qui existent entre la constitution chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase. *C. R. Ac. Sc.*, 18 mai 1896, p. 1132.

CHAPITRE VII

Distribution des ferments oxydants dans la série animale.

Nous avons cherché si les oxydases existaient dans les différents groupes de la série animale et dans quels organes elles étaient localisées.

Nous avons ensuite étudié avec détail les oxydases des Lamellibranches, des Crustacés et des Mammifères.

Nos expériences de Roscoff sur les Invertébrés marins ont été faites avec la collaboration de M. Piéri, professeur au Lycée de Rochefort.

I. — Cœlentérés.

Sagartia parasitica. — Roscoff, 2, 7, 12 août 1897.

Quelques lambeaux du *tégument* traités par la teinture de gaïac donnent une coloration verdâtre peu caractéristique avec quelques points d'un bleu très net.

Tentacules, *id.*

La *sécrétion muqueuse*, dont certaines parties du tégument se recouvrent lorsque cette actinie est inquiétée, est recueillie. Elle donne une réaction assez nette avec la teinture de gaïac.

La paroi du corps blessée laisse échapper un peu de liquide qui donne également la réaction.

Une de ces actinies hachée dans l'eau chloroformée fournit une macération qui, après filtration donne une réaction assez nette avec la teinture de gaïac.

Lorsque l'animal a été plongé dans l'eau bouillante, ses tissus ni leurs macérations ne donnent plus aucune réaction.

En résumé, nous voyons qu'ici l'oxydase, peu active à la vérité, est localisée dans la sécrétion muqueuse du tégument surtout celle qui prend naissance à la base des tentacules lorsque l'animal inquiet se ferme.

II. — Echinodermes.

Strongylocentrotus lividus. — Roscoff, 5 août 1897.

Le sang donne avec la teinture de gaïac une coloration verdâtre. Avec la solution d'hydroquinone à 1 0/0, on obtient une teinte rose puis brune, on perçoit l'odeur caractéristique de la quinone, mais on n'obtient pas de lamelles vertes de quinhydrone.

Le tube digestif. — Réaction nulle avec les 2 réactifs précédents.

La membrane péri-buccale donne avec la teinture de gaïac une coloration verdâtre avec des traînées bleues très nettes.

Echinus esculentus. — Roscoff, 8 août 1897.

Les résultats sont les mêmes que pour l'espèce précédente.

CONCLUSION. — Chez les Echinodermes étudiés, l'oxy-

dase est peu énergique ; ce ferment n'a pu être décelé que dans le sang et la membrane péri-buccale.

III. — **Vers.**

Myxicola infundibulum. — Roscoff, 12 août 1897.

1° *Tégument*. — Réaction douteuse.

2° *Tube digestif*. — Réaction nulle.

3° *Branchies*. — Réaction nette, même très intense avec la base des branchies.

Un autre exemplaire de la même espèce préalablement placé dans l'eau bouillante ne donne plus aucune réaction.

Arenicola piscatorum. — Roscoff, 17 août 1897.

1° *Sang*. — Coloration verdâtre douteuse.

2° *Téguments*. — Réaction nulle.

3° *Branchies*. — Réaction nette.

Un autre exemplaire de la même espèce qui a été plongé dans l'eau bouillante pendant quelques minutes ne donne plus aucune réaction.

Une macération du tégument haché dans l'eau chloroformée donne par filtration un liquide bien peu riche en oxydase.

Nereis Dumerilii. — Roscoff, 8 août 1897.

1° *Sang*. — Réaction assez nette.

2° *Téguments*. — Réaction nulle.

Un autre exemplaire placé dans l'eau bouillante ne donne plus aucune réaction.

Sabellide (non déterminée). — Roscoff, 7 août.

1° *Téguments*. — Réaction douteuse.

2° *Branchies*. — Réaction très nette surtout à la base.

CONCLUSION. — Chez les Annélides, l'oxydase n'a pu être décelée nettement que dans le sang et dans la branchie, et particulièrement à la base de ce dernier organe.

IV. — Crustacés.

Maïa Squinado. — Roscoff, septembre 1896.

On défibrine du sang de ce crustacé à mesure qu'il s'écoule d'une blessure faite à la patte.

Le sang est filtré, les flocons de fibrine sont retenus par le filtre.

1° Le sang filtré ne donne avec la teinture de gaïac aucune réaction sensible.

2° La fibrine recueillie sur le filtre et plongée dans la teinture de gaïac donne une réaction très nette.

Si on recueille quelques-uns de ces flocons très ténus de fibrine et qu'on les place à l'étuve à 40° dans quelques gouttes de chlorure de sodium à 10 0/0, ces flocons se dissolvent en partie et la liqueur obtenue donne avec la teinture de gaïac une coloration bleue très intense et qui se produit immédiatement.

Le même liquide porté à l'ébullition ne produit plus aucune réaction.

Remarquons que la fibrine laissée au contact de l'air noircit, devient insoluble dans le NaCl à 10 0/0 et ne communique plus aucune propriété oxydante à ce liquide quel

que soit le temps pendant lequel elle y séjourne à l'étuve à 40°.

Platycarcinus pagurus. — Roscoff, septembre 1896.

Comme pour le maïa squinado, le sang lui-même ne donne avec la teinture de gaïac qu'une réaction bien faible ou nulle tandis que les flacons de fibrine donnent une réaction très nette.

Carcinus mænas. — Roscoff, septembre 1896.

Résultats identiques.

CONCLUSION. — Chez les Crustacés étudiés, le sang et surtout les flocons de fibrine obtenus en battant le sang nous ont montré les propriétés des oxydases (1).

V. — Insectes.

Nous avons surtout expérimenté sur un orthoptère commun dans les vignes de Bourgogne en septembre et octobre l'*Ephippium vicium*.

En provoquant l'autotomie d'une des pattes postérieures de l'animal ou en faisant une petite incision à la paroi de l'abdomen très volumineux dans cette espèce, on obtient quelques gouttes de sang.

Ce sang après quelques minutes d'exposition à l'air

(1) MM. ABELOUS et BIARNÈS, Sur l'existence d'une oxydase chez les crustacés, *Archives de physiologie*, 1897, p. 277, sont arrivés à des résultats presque identiques. Nous n'avons pas recherché l'oxydase dans les branchies et le foie, organes dans lesquels ces expérimentateurs l'ont trouvée.

donne par addition de teinture de gaïac une coloration bleue très nette.

Si on ouvre l'animal et qu'on laisse tomber immédiatement quelques gouttes de teinture de gaïac dans la cavité générale, on n'obtient en général pas de réaction ; mais si on recommence la même opération après avoir laissé l'animal ouvert à l'air libre pendant quelques minutes, on obtient une coloration bleue intense qui est surtout abondante dans les parties déclives de l'abdomen où le sang s'est accumulé.

Nous chercherons ultérieurement à expliquer ces faits.

Différents coléoptères du genre *Carabus* nous ont donné des résultats très semblables.

CONCLUSION. — Chez les Insectes étudiés, nous avons pu déceler dans le sang une oxydase qui est surtout facile à mettre en évidence lorsque ce sang est resté exposé quelque temps à l'air libre.

VI. — **Mollusques.**

1° ACÉPHALES (1).

C'est le groupe d'invertébrés chez lequel nous avons obtenu les réactions de l'oxydase avec le plus de netteté et d'intensité.

(1) Pour plus de détails, touchant la présence du ferment oxydant dans ce groupe de mollusques, nous renvoyons au mémoire publié avec la collaboration de M. PIERI dans les *Archives de physiologie*, 1897, p. 60.

A. — *Constatacion directe de l'oxydase dans les branchies et les palpes.*

Action sur la teinture de gaïac. — Si on coupe une branchie de *Pecten maximus* et qu'on recueille le liquide qui s'en écoule, ce liquide additionné de teinture de gaïac donne une coloration bleue des plus nettes et des plus intenses.

Le même liquide chauffé à 100° ne donne plus aucune réaction.

La branchie elle-même déposée dans la teinture de gaïac se colore rapidement en bleu.

Il en est de même et à un plus haut degré encore des palpes.

Ces organes préalablement chauffés à 100° ne donnent plus aucune réaction.

Mêmes expériences avec des organes provenant d'*Artemis exoleta*, de *Mya arenaria* et de *Solen ensis* var. *magna* dont les branchies paraissent particulièrement riches en oxydase.

Action sur le gaïacol. — La teinture de gaïac n'est pas le seul réactif sur lequel agisse l'oxydase des acéphales.

Le liquide qui s'écoule des palpes ou des branchies de *Solen ensis*, *Pecten maximus*, *Ostrea edulis* donne une réaction nette avec la solution de gaïacol.

Action sur l'hydroquinone. — Avec l'hydroquinone à 1 0/0 on obtient une coloration jaune rougeâtre assez rapide et on perçoit nettement l'odeur caractéristique de la quinone.

Il n'a pas été possible dans ces conditions d'obtenir des cristaux de quinhydrone.

Obtention des cristaux de Quinhydrone. — En nous plaçant dans des conditions particulières, nous sommes même parvenus à obtenir des lamelles vertes de quinhydrone. C'est en nous appuyant sur ce fait que l'optimum de température pour l'action du ferment oxydant est d'environ 50-60°.

EXPÉRIENCE 1. — Une branchie d'*Anodonta cygnea* est coupée en morceaux, on la place dans une petite capsule de platine sur un bain-marie dont on élève progressivement la température jusqu'à 50°. On ajoute alors dans la capsule 2 centimètres cubes de la solution d'hydroquinone à 1 0/0. Au bout de quelques minutes, il se produit un changement de coloration de cette solution, et on perçoit en même temps une odeur très manifeste de quinone. On ajoute encore 2 centimètres cubes de la solution d'hydroquinone et on laisse au bain-marie pendant plusieurs heures.

On constate alors :

1° Que la branchie baigne dans une petite quantité de liquide jaune rougeâtre qui exhale une forte odeur de quinone.

2° Que les portions de cette branchie qui ne baignent plus dans le liquide sont couvertes de lamelles vertes de quinhydrone.

EXPÉRIENCE 2. — L'expérience précédente est répétée avec une branchie d'*Ostrea edulis* (Marenne verte).

On place sur le bain-marie à 60° la branchie baignant dans 3 centimètres cubes de la solution d'hydroquinone à 1 0/0. Au bout d'un quart d'heure, le liquide est devenu rougeâtre et on perçoit nettement une odeur de quinone. On laisse le liquide s'évaporer, et on constate que la branchie est couverte de lamelles de quinhydrone.

Un autre morceau de branchie chauffé pendant quelques instants

à 100° et traité ensuite de la même manière que les précédents ne se couvre pas de lamelles de quinhdrone.

C'est du reste, le seul procédé qui nous ait permis d'obtenir des lamelles de quinhdrone.

Le liquide de macération des palpes et des branchies, même lorsqu'il donnait une réaction très nette avec la teinture de gaïac ne nous a jamais permis d'obtenir des cristaux de quinhdrone lorsqu'il a été traité par la méthode précédente.

B. — *Extraction de l'oxydase des tissus précédents.*

Nous avons fait de nombreuses expériences à ce sujet, nous allons en citer quelques-unes :

Le 5 décembre 1896, les branchies de 6 marennes vertes sont hachées et réparties dans trois flacons :

A. — Branchies de 20 marennes.

Acide salicylique à 2 0/0, 60 cc.

B. — Branchies de 20 marennes.

Eau saturée de chloroforme, 60 cc.

C. — Branchies de 20 marennes.

Acide acétique à 2 0/0, 60 cc.

Les 3 flacons hermétiquement fermés sont placés à l'obscurité à la température du laboratoire (15°).

Environ 40 heures après, on filtre les différents liquides qui sont limpides et incolores (1).

RÉSULTATS :

1° Flacon A. — a) Trois centimètres cubes additionnés de quelques

(1) Cette expérience avait pour but en la comparant à d'autres de voir si le pigment vert de ces marennes avait une influence dans les phénomènes d'oxydation. Il nous a été impossible de trouver aucune différence à ce sujet entre les marennes blanches et les marennes vertes.

gouttes de teinture de gaïac donnent au bout de quelques instants une coloration bleue très nette.

La même quantité de liquide chauffée à 100° ne donne plus aucune réaction.

b) A 3 centimètres cubes de la solution A, on ajoute 3 centimètres cubes de solution de gaïacol. Au bout d'un quart d'heure environ, on a une teinte rose très manifeste.

Aucune réaction dans un tube chauffé à 100°.

c) Dans une petite capsule, on met liq. de A. 3 centimètres cubes, sol. hydroquinone à 1 0/0 3 centimètres cubes.

On place sur le bain-marie à 50°.

Au bout de quelques instants, le liquide devient brunnâtre et on perçoit une odeur de la quinone.

Rien de pareil avec le même liquide préalablement bouilli.

2° *Flacon B.* — Le liquide filtré de B a été examiné comme celui de A. Nous avons pu reproduire toutes les réactions précédentes. Elles ont été encore plus intenses que dans le cas précédent et se sont manifestées encore plus rapidement. La réaction avec l'hydroquinone a été particulièrement nette ; il nous a cependant été impossible d'obtenir des cristaux de quinhydrone comme avec la branchie elle-même chauffée au bain-marie.

Le liquide précédent bouilli n'a plus donné aucune de ces réactions.

3° *Flacon C.* — Le liquide filtré ne nous a donné avec les réactifs précédents que de bien faibles résultats. La teinture de gaïac seule nous a donné une légère coloration d'un bleu verdâtre.

AUTRE EXPÉRIENCE, 7 décembre 1896. — On prépare les deux flacons :

A. — Branchies de 17 huîtres marennes vertes.

Acide salicylique à 2 0/0, 50 cc.

B. — Branchies de 17 huîtres.

Acide acétique à 1 0/0, 50 cc.

Les deux flacons sont placés à l'obscurité à la température du laboratoire.

Le 11 (après 4 jours de macération), on filtre le contenu des flacons A et B. Le filtrat est limpide et incolore.

RÉSULTATS :

1^o *Flacon A.* — Réaction très nette avec la teinture de gaïac. Moins nette avec le gaïacol et l'hydroquinone.

Le liquide bouilli ne donne aucune réaction.

2^o *Flacon B.* — Avec la teinture de gaïac, on a la réaction, mais moins rapidement et moins nettement que dans le cas précédent. La réaction avec le gaïacol et l'hydroquinone ne se produit qu'au bout de 24 heures de contact.

CONCLUSIONS. — De ces deux expériences et de plusieurs autres très analogues qu'il est inutile de rapporter, il peut résulter que les macérations des branchies et des palpes dans différents liquides fournissent des solutions qui ont toutes les propriétés de celles des ferments oxydants.

Ce sont les macérations dans l'eau chloroformée qui se sont toujours montrées les plus efficaces.

C. — *L'Oxydase des branchies des Acéphales est précipitable par l'alcool (1).*

Roscoff, 5 septembre 1896.

Les branchies et les palpes de 36 *Artemis exoleta* sont hachées dans 100 centimètres cubes d'une solution saturée d'acide salicylique. On laisse macérer à la température du laboratoire (15°) pendant 24 heures et on filtre.

La liqueur obtenue donne une réaction nette avec la teinture de gaïac, le gaïacol, etc.

On additionne cette liqueur de deux fois son volume d'alcool à 90° et on obtient un précipité peu abondant. Une partie de ce précipité

(1) Expérience empruntée au mémoire sur l'oxydase chez les acéphales. *Archives de physiologie*, 1897, p. 60.

est rapidement séchée entre deux feuilles de papier buvard et délayée dans quelques centimètres cubes d'eau distillée. La liqueur obtenue donne très nettement la réaction avec la teinture de gaïac. Une autre partie de cette même liqueur portée à l'ébullition ne donne plus aucune réaction.

Si on recueille le précipité sur un filtre plat et qu'on le dessèche à l'air libre, à la température du laboratoire ou à 40°, il devient grisâtre, puis noir ; il est alors insoluble, et l'eau dans laquelle on le plonge ne donne plus de réaction avec la teinture de gaïac.

Le ferment oxydant du latex de l'arbre à laque se comporte exactement de même quand, après l'avoir précipité par l'alcool, on le dessèche à l'air libre.

D. — *Présence de l'oxydase dans le sang des Lamellibranches.*

Roscoff, 12 août 1897.

Le sang de *Mya arenaria* qui s'écoule par une incision faite au pied de l'animal est reçu dans un cristalliseur.

Les premières portions de ce sang donnent avec la teinture de gaïac une réaction faible, les dernières portions une réaction beaucoup plus énergique. Il en est de même avec le liquide de *Venus verrucosa* et de *Pecten maximus*.

Les dernières portions du sang de ce dernier Acéphale donnent avec l'hydroquinone une réaction très nette, on perçoit l'odeur de la quinone, mais il n'est toujours pas possible d'obtenir des lamelles de quinhydron.

Dans tous les cas, le sang bouilli ne donne plus aucune réaction.

En additionnant le sang (et surtout les dernières portions qui s'écoulent de la blessure) de deux volumes d'alcool à 90°, on obtient un précipité qui, rapidement séché entre deux feuilles de papier buvard se redissout dans l'eau distillée et fournit une liqueur très active.

Le sang de *Mya arenaria* conserve ses propriétés oxydantes pendant plus de 15 jours lorsqu'on a soin de le conserver dans un flacon soigneusement fermé et lorsqu'on l'additionne de quelques cristaux de thymol.

Au contraire, si, après l'avoir additionné d'un même antiseptique on le laisse exposé à l'air libre et à la lumière, il ne tarde pas à perdre toute propriété oxydante (1).

E. — *Impossibilité de mettre en évidence l'oxydase dans les autres organes des Acéphales.*

Des macérations dans l'eau chloroformée et l'acide salicylique de la masse générale des Acéphales précédents ou de leur glande digestive et de leurs glandes génitales isolées ne nous ont jamais permis d'y mettre en évidence la présence de l'oxydase.

Ce résultat négatif ne prouve pas que l'oxydase soit nécessairement absente de ces organes, mais elle peut être masquée par la présence de substances réductrices qui passent avec l'oxydase dans le liquide de macération.

La présence de telles substances est rendue probable par ce fait que le liquide de macération de la masse générale ajouté au liquide de macération très actif des branchies ou des palpes produit sur ce dernier une action empêchante très marquée vis-à-vis des réactifs ordinaires des oxydases.

Du reste de telles substances réductrices qui viennent masquer les réactions des oxydases ont été mises en évidence dans le sérum et dans l'extrait de foie des mammifères.

Chez les Acéphales, nous avons pu nettement mettre en évidence l'action réductrice du sperme ; cette action ré-

(1) Nous nous sommes assuré également que le liquide de macération des branchies et des palpes conservait aussi pendant plusieurs jours ses propriétés oxydantes lorsqu'il est conservé à l'abri de l'oxygène atmosphérique et de la lumière.

ductrice paraît même en grande partie due à la vie des spermatozoïdes, car cette action est atténuée, presque supprimée même lorsqu'on a porté ce liquide pendant quelques minutes au bain-marie à la température de 50 à 60°.

*Liste des Lamellibranches qui ont été étudiés au cours
de ces expériences :*

<i>Artemis exoleta.</i>	<i>Pentunculus glyçimeris.</i>
<i>Mya arenaria.</i>	<i>Pecten jacobæus.</i>
<i>Tapes pullastra.</i>	<i>Pecten maximus.</i>
<i>Tellina crassa.</i>	<i>Solen ensis.</i>
<i>Venus verrucosa.</i>	<i>Anodonta cygnea.</i>

2° GASTÉROPODES.

Halotis tuberculata. — Roscoff, 12 septembre 1896.

Branchie. — Le liquide qui s'en écoule produit avec la teinture de gaïac une coloration bleue très nette.

Une autre branchie chauffée au bain-marie pendant quelques minutes à 55° expulse quelques gouttes de liquide qui donne une coloration encore plus énergique que précédemment avec le même réactif.

Une branchie préalablement placée dans l'eau bouillante ne donne plus aucune réaction.

Sang. — Le sang *filtré* ne donne presque aucune réaction.

Le sang non filtré donne une réaction nette, surtout celui qui s'écoule en dernier lieu d'une blessure faite au pied de l'animal.

Ce même sang, chauffé pendant quelques minutes à 55-60° puis refroidi, nous a toujours donné des résultats très nets.

Le précipité obtenu en additionnant le sang non filtré de 2 volumes d'alcool à 90° a fourni dans l'eau distillée une solution qui s'est montrée active sur la teinture de gaïac et sur la solution d'hydroquinone.

Nassa reticulata. — Roscoff, 4 août 1897.

Branchie. — Avec la teinture de gaïac, réaction un peu lente à se produire, mais nette.

Paroi de la cavité branchiale. — Même réaction.

Sang. — Réaction faible.

Macération des branchies. — On hache une douzaine de branchies de *Nassa* dans une solution d'acide salicylique à 2 0/0. On laisse en contact 6 heures à la température du laboratoire.

Le liquide filtré donne avec la teinture de gaïac une réaction nette.

Le même liquide bouilli ne donne plus aucune réaction.

La macération dans le même liquide des parois de la cavité branchiale donne des résultats très analogues.

Philine aperta. — Roscoff, 11 août 1897.

Le *manteau* et sa macération dans l'eau chloroformée donnent une réaction nette par la teinture de gaïac et la solution d'hydroquinone.

Le liquide qui s'écoule d'une blessure faite à l'animal donne aussi une réaction nette avec la teinture de gaïac.

Arion rufus. — Le sang et la membrane pulmonaire contiennent l'oxydase qu'on peut y déceler comme précédemment avec la teinture de gaïac ou l'hydroquinone.

Le mucus sécrété par l'animal contient aussi l'oxydase.

CONCLUSIONS. — Chez les Gastéropodes examinés, nous avons pu déceler l'oxydase dans le manteau, dans le sang et dans le mucus.

Liste des animaux étudiés :

<i>Buccinum undatum.</i>	<i>Helix aspersa.</i>
<i>Haliotis tuberculata.</i>	<i>Doris tuberculata.</i>
<i>Littorina littorea.</i>	<i>Philine aperta.</i>
— <i>rudis.</i>	<i>Arion rufus.</i>
<i>Nassa reticulata.</i>	<i>Patella vulgata.</i>

3° CÉPHALOPODES.

Sepia officinalis. — Le sang de *Sepia* battu en présence de l'oxygène atmosphérique prend, comme on sait, une belle couleur bleue. Il se forme en même temps de petits flocons de fibrine.

Ceux-ci recueillis sur un filtre et séchés avec du papier buvard sont ensuite placés dans une petite quantité de chlorure de sodium à 10 0/0 et mis à l'étuve à 40°.

Dans ces conditions, ils se dissolvent en partie et donnent une liqueur qui fournit une réaction énergique avec la teinture de gaïac et la solution d'hydroquinone.

Le même liquide chauffé à la température d'ébullition ne donne plus ces réactions.

Nous n'avons pu nous procurer d'autres exemplaires de *Sepia*, ni d'autres espèces pour poursuivre nos recherches sur les céphalopodes.

4° TUNICIERS.

M. Giard (1) a constaté qu'on obtient avec la teinture de gaïac un bleuissement immédiat et très intense chez le *Botrylloïdes cyanescens* et chez l'*Ascidia fumigata*.

Nous avons repris cette étude sur une autre espèce.

Ascidia mentula (Var. *rosea*). Roscoff, 9-12 août 1897.

Le manteau sectionné et arrosé de quelques gouttes de teinture de gaïac prend presque immédiatement une teinte bleue.

Le manteau haché dans l'eau chloroformée et laissé en contact quelques heures fournit par filtration une liqueur limpide qui donne une réaction nette avec la teinture de gaïac et la solution d'hydroquinone.

Remarquons en passant que cette macération de manteau dans

(1) GIARD, Sur l'existence chez certains animaux d'un ferment bleuissant la teinture alcoolique de gaïac. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 22 mai 1896, p. 482.

l'eau chloroformée bien que présentant d'une façon très nette les propriétés des oxydases ne contient qu'une proportion extrêmement faible de substances albuminoïdes, car elle ne donne aucune réaction avec les réactifs les plus sensibles des albuminoïdes : Biuret. Liqueur de Millon. Réactif xanto-protéique.

Le même liquide de macération bouilli ne donne plus aucune réaction (1).

Le manteau haché dans l'*acide salicylique* fournit aussi un liquide assez actif, mais moins que dans le cas précédent.

Il est du reste à remarquer que les couches périphériques du manteau donnent une réaction beaucoup plus nette que les couches profondes soit qu'on opère sur le manteau *in situ* avec la température de gaiac, soit qu'on fasse des macérations dans l'eau chloroformée des couches de profondeur diverse.

VII. — Mammifères.

Sans parler de nouveau des expériences de Schmiedeberg, Jacquet, Salkowsky et des premières expériences d'Abelous et Biarnès, expériences qui avaient pour but d'étudier la transformation *in vitro* de l'aldéhyde salicylique en acide salicylique sous l'influence des extraits de certains organes et du sang et que nous avons rapportées aux pages 5 et 6, nous passerons aux expériences plus récentes dans lesquelles on a cherché à extraire le ferment lui-même des tissus.

(1) Nous avons constaté encore pour cette espèce que la macération chloroformée du manteau conserve longtemps (15 jours environ) ses propriétés oxydantes lorsqu'on la tient enfermée à l'abri de la lumière et surtout de l'oxygène de l'air.

Paul Carnot (1) établit que la salive fraîche et filtrée donne la réaction des oxydases avec le réactif de Rœhmann et Spitzer, avec la teinture de gaïac (mais seulement une teinte verte), avec l'hydroquinone et le pyrogallol.

La salive filtrée sur bougie Chamberland conserve ses propriétés oxydantes.

Enfin le ferment est précipitable par l'alcool, par le sulfate de chaux.

Le sperme comme l'avait déjà vu Poehl oxyde énergiquement.

Hugounenq et Paviot (2) établissent que les fragments d'une tumeur chloromateuse donnent une coloration bleue avec la teinture de gaïac. Les auteurs remarquent que la zone qui produit l'oxydation la plus intense répond à celle de développement le plus actif.

Nous avons enfin à retenir les intéressants travaux de MM. Abelous et Biarnès (3) qui, dans une série de communications à la Société de biologie établissent que le parenchyme de certains organes débarrassés de leur sang par le lavage fournissent la réaction avec la teinture de gaïac. C'est ainsi que la rate écrasée avec la teinture de gaïac donnent une réaction intense ; il en est de même et à un plus haut degré encore de la fibrine.

(1) PAUL CARNOT, Sur un ferment de la salive et de quelques autres sécrétions. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 5 juin 1896, p. 552.

(2) HUGOULENQ ET PAVIOT, Sur les propriétés oxydantes peut-être dues à des actions diastasiques de quelques tumeurs malignes. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 3 avril 1896, p. 552.

(3) ABELOUS ET BIARNÈS, Sur l'existence d'une oxydase chez les mammifères. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 20 mars 1897, p. 285. — Nouvelles expériences sur l'oxydase des mammifères. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 22 mai 1897, p. 493.

Les mêmes organes ou la fibrine digérés par la papaïne fournissent un filtrat qui ne contient pas d'oxydase et un résidu retenu par le filtre qui contient ce ferment.

L'oxydase qui paraît ainsi adhérer très énergiquement aux tissus peut cependant passer en solution lorsqu'on traite les résidus précédents par une solution de sel neutre (NaCl 10 0/0, AzO^3K à 8 0/0).

Le ferment est reprécipité par la dialyse, la dilution, un courant d'acide carbonique, c'est-à-dire par tous les agents qui produisent la précipitation des globulines qui sont en solution.

C'est en effet la conclusion à laquelle les auteurs arrivent (1). Ils affirment chez les mammifères l'existence de substances parfaitement caractérisées au point de vue chimique, de globulines qui posséderaient les propriétés des ferments oxydants.

Enfin, mon maître, M. Dastre et M. Floresco (2) sans conclure à l'existence certaine d'une oxydase dans la bile pensent qu'un tel ferment doit intervenir dans l'oxydation de la bilirubine dans les canaux et surtout dans la vésicule biliaire.

En effet : 1° dans les voies biliaires et dans la vésicule la bile ne rencontre pas les conditions qui permettent de

(1) ABELOUS et BIARNÈS, Sur l'existence chez les mammifères de globulines possédant les propriétés des ferments solubles oxydants. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1897, p. 576.

(2) DASTRE et FLORESCO, Contribution à l'étude de la bilirubine et de sa transformation en biliverdine. *Archives de physiologie*, 1897, p. 474. — Origine dans la bile des pigments biliprasiniques jaune et vert. *Archives de physiologie*, 1897, p. 737.

passer de la bilirubine ou des bilirubinales aux pigments biliprasiniques et enfin à la biliverdine (Conditions de lumière, de chaleur, d'oxygénation) ;

2° Les faits suivants plaident encore en faveur de l'hypothèse d'une oxydase biliaire.

La bile fraîche bleuit la teinture de gaïac, ce que ne fait plus la bile bouillie.

La *laccase* transforme la bile jaune en bile verte et favorise l'oxydation de la bilirubine dans les solutions artificielles ; c'est-à-dire la formation des pigments biliprasiniques et des biliverdinates.

De même la bile verte (qui est riche en oxydase) peut transformer une certaine quantité de bile jaune en bile verte, ce qu'elle ne peut plus faire après ébullition.

CHAPITRE VIII

Étude de l'oxydase du sang des mammifères.

Les résultats que nous avons obtenus en août et septembre 1896 avec la fibrine provenant du sang des Crustacés et des Céphalopodes nous avaient engagés M. Piéri et moi à rechercher si l'oxydase n'existait pas aussi dans la fibrine du sang des mammifères.

Des solutions de fibrine de veau dans le NaCl à 10 0/0 et le NaFl à 2 0/0 nous avaient en effet donné des résultats très nets lorsque nous les avions traitées par les réactifs des oxydases (1).

Nous n'avons pas publié ces faits à cause des différences très notables dans la puissance d'oxydation que présentaient nos solutions de fibrine dans les sels neutres.

Cette variabilité dans les résultats a aussi frappé MM. Abelous et Biarnès qui les attribuent à des différences individuelles (2). Sans contester d'une façon absolue l'importance de l'âge de l'animal et l'état dans lequel il se trouve, nous pensons que le manque de constance dans les résultats tient beaucoup plus à la façon dont on défibrine le sang et surtout à la manière dont la fibrine est lavée.

(1) Ces résultats n'ayant pas été publiés en temps opportun, la priorité sur ce point appartient sans contestation possible à MM. Abelous et Biarnès.

(2) ABELOUS et BIARNÈS, Sur l'existence d'un oxydase chez les mammifères. *Compt. rend. Soc. biol.*, 20 mars 1897, p. 285.

La fibrine abandonnée dans l'eau courante et froide (1) pendant 24 heures donne des réactions bien faibles, quelquefois nulles après sa dissolution dans les sels neutres. Nous avons au contraire obtenu des résultats toujours très nets en débarrassant rapidement la fibrine des globules rouges qu'elle contenait et en la faisant dissoudre ou digérer immédiatement.

En général, nous avons employé pour la défibrination de petites brosses métalliques cylindriques de même forme que celles qui servent à nettoyer les tubes à essai.

Les fils métalliques se couvrent d'un réseau de fibrine formé de fils très fins ; il suffit d'agiter les brosses pendant quelques minutes dans l'eau stérilisée pour que les filaments de fibrine deviennent d'une blancheur parfaite. En général, les brosses elles-mêmes recouvertes de fibrine étaient plongées dans le liquide de digestion ou de dissolution, et on mettait le tout à l'étuve à 40°.

Nous allons citer quelques-unes de ces expériences qui viennent confirmer celles de MM. Abelous et Biarnès.

EXPÉRIENCE du 16 janvier 1897. — Chien à jeun. Le sang de l'artère crurale est reçu dans un verre et défibriné au moyen des balais métalliques décrits précédemment. En quelques minutes les balais plongés dans l'eau distillée stérilisée sont recouverts de fibrine très blanche. On les plonge dans un vase contenant du NaFl à 1 0/0 et on met le vase au bain-marie à 45°-50°. Douze heures après, on constate.

Que le fluorure de sodium non filtré dans lequel la fibrine s'est en partie dissoute donne une teinte bleue très intense avec la teinture de gaïac.

(1) Nous avons, bien entendu, veillé à ce que les phénomènes de putréfaction n'interviennent point.

Que le même liquide filtré donne encore la réaction, mais moins nettement.

Que le même liquide bouilli ne donne plus aucune réaction,

On voit donc, comme l'ont vu d'ailleurs MM. A belous et Biarnès que l'oxydase paraît adhérer assez énergiquement à la fibrine.

EXPÉRIENCE du 31 mai 1897. — Dans un flacon, on met :

Fluorure de sodium à 2 0/0. . . . 200 cent. cubes

Fibrine de porc. 30 grammes

Le flacon est mis à l'étuve à 40°.

Le 2 juin, une partie de la fibrine s'est dissoute, on filtre une partie de la solution.

Ce filtrat donne avec une grande netteté la réaction avec la teinture de gaïac.

L'ébullition supprime toute réaction.

On replace le flacon à l'étuve à 40°.

Les jours suivants on prélève un peu de liquide qu'on traite comme précédemment et on constate qu'à mesure que la dissolution s'opère et que la richesse de la liqueur en fibrine augmente, on a un liquide de moins en moins actif sur la teinture de gaïac.

La couleur bleue qui est peu intense disparaît rapidement, surtout dans les couches inférieures du liquide, tandis que la surface qui est en contact avec l'oxygène atmosphérique reste colorée plus longtemps.

En somme, tout se passe comme si la liqueur contenait en même temps que l'oxydase une substance réductrice.

Nous reviendrons ultérieurement sur l'interprétation de ces faits.

EXPÉRIENCE du 31 mai 1897. — On met dans un flacon à l'étuve à 40° :

Fluorure de sodium à 2 0/0. . . . 180 cent. cubes

Trypsine (solution dans la glycérine). 20 » »

Fibrine de porc 20 grammes

Le lendemain une grande partie de la fibrine a été digérée, on filtre une partie de la liqueur.

Le filtrat donne une réaction nette avec la teinture de gaïac, mais la coloration bleue disparaît rapidement.

Le même filtrat bouilli ne donne plus aucune réaction.

Si on laisse le filtrat pendant quelques heures à l'air libre, il perd la propriété de bleuir la teinture de gaïac.

On remet le flacon à l'étuve à 40°.

Le 2 juin et les jours suivants, on obtient encore la réaction avec le filtrat, mais son intensité va chaque jour en décroissant.

EXPÉRIENCE du 29 mai. — On met dans un flacon à l'étuve à 40° :

Suc gastrique artificiel. 250 grammes

Fibrine de porc 20 »

Le 2 juin, on filtre une partie du liquide.

Le filtrat ne donne aucune réaction avec la teinture de gaïac.

Le filtrat est acide (le suc gastrique avait été acidifié à 3 p. 0/00).

On le neutralise au moyen du carbonate de soude et on provoque la formation d'un précipité de syntonine. Le liquide est de nouveau filtré.

On constate que ni le filtrat, ni la syntonine qui est restée sur le filtre ne donnent la réaction avec la teinture de gaïac.

Il semble donc que l'oxydase a été détruite par la digestion en milieu acide.

CONCLUSION. — Des expériences précédentes nous pouvons tirer la conclusion que la fibrine contient une oxydase qui peut passer en solution dans les liquides qui ont la propriété de dissoudre ou de digérer la fibrine (1) lorsque

(1) Nous sommes ici en désaccord sur un point avec MM. ABELOUS et BIARNÈS qui ont constaté que par la digestion de la fibrine on obtient un liquide doué de propriétés oxydantes qui disparaissaient quand on le filtrait, le résidu retenu par le filtre possédant lui-même des propriétés oxydantes. ABELOUS et BIARNÈS, Nouvelles expériences sur l'oxydase des mammifères. *Compt. rend. Soc. biol.*, 22 mai 1897, p. 493.

Il est vrai que ces auteurs ne se servent pas de trypsine, mais de papaïne.

cette digestion ou cette dissolution se fait en milieu neutre ou légèrement alcalin. L'oxydase serait au contraire détruite par une digestion en milieu acide.

Devons-nous aller plus loin et identifier le ferment oxydant avec la fibrine ou avec d'autres globulines existant dans les différents organes ?

Cela paraît bien être l'opinion de MM. Abelous et Biarnès ; pour eux ce serait la globuline, espèce chimique elle-même qui posséderait les propriétés du ferment oxydant (1).

Telle paraît être aussi l'opinion de Moritz Traube qui pensait que la myosine était un ferment oxydant sans d'ailleurs fournir aucune preuve à l'appui de cette opinion.

A ce point de vue, notre avis est tout à fait différent de celui des auteurs précédents.

Certaines remarques faites au cours des expériences précédentes ne plaident pas en faveur de la globuline ferment oxydant.

C'est ainsi que la fibrine lavée très longtemps à l'eau courante ne donne plus par dissolution ou digestion des liqueurs agissant nettement sur la teinture de gaïac. Il semble que le ferment qui teignait la fibrine et y adhérait fortement a fini par l'abandonner sous l'influence d'un lavage très prolongé.

Nous avons remarqué ensuite (pages 50 et 51), que l'intensité de l'action oxydante d'une solution de fibrine

(1) ABELOUS et BIARNÈS, Sur l'existence chez les mammifères de globulines possédant les propriétés des ferments solubles oxydants. *Compt. rend. Soc. biol.*, 1897, p. 576.

n'était pas en raison directe de sa teneur en fibrine. Bien au contraire qu'une liqueur qui contient une grande quantité de fibrine dissoute ou digérée n'a plus que des propriétés oxydantes très atténuées et paraît même contenir des substances très réductrices qui masquent la réaction du ferment oxydant.

C'est encore là un fait qui cadre mal avec l'hypothèse de la globuline ferment oxydant.

Nous avons donc cherché par de nouvelles expériences à localiser l'oxydase dans une partie déterminée du sang.

CHAPITRE IX

L'oxydase est liée au leucocyte.

1° Les globulines du plasma ont-elles des propriétés oxydantes ?

Le 30 juillet 1897, on reçoit de la fémorale d'un chien 640 centimètres cubes de sang dans un flacon qui contient 3 grammes d'oxalate neutre de sodium.

Ce sang est aussitôt centrifugé (pendant une durée de 4 heures). Le plasma très limpide est décanté (1).

On sature ce plasma de sulfate de magnésie, et on provoque ainsi la précipitation des deux globulines du plasma : la sérumblobuline et le fibrigène.

On accélère la précipitation de ces 2 globulines par la centrifugation, on décante le liquide et on recueille le précipité de globulines sur un filtre plat.

Ce précipité est lavé avec une solution concentrée de sulfate de magnésie.

Une petite quantité de ce précipité rapidement essuyé entre deux feuilles de papier buvard est arrosée de quelques gouttes de teinture de gaïac ; il ne se produit aucune coloration bleue.

On fait alors deux parts du précipité.

L'une est mise à dialyser plusieurs jours à la glacière en présence de l'eau distillée qu'on renouvelle.

L'autre placée sur un filtre plat est lavée à l'eau distillée.

Le précipité de globuline ainsi débarrassé du sulfate de magnésie

(1) On a soin de ne pas prendre la couche de plasma qui confine à la couche de leucocytes.

dont il était imprégné est placé dans le fluorure de sodium à l'étuve à 40°.

Les solutions ainsi obtenues ne donnent aucune réaction avec la teinture de gaïac (1).

L'oxydase du reste n'a pas été détruite par le traitement par le sulfate de magnésie, car on s'assure qu'une solution de laccase à 1 0/0 donne une réaction tout aussi intense avec la teinture de gaïac lorsqu'elle est saturée par le sulfate de magnésie.

CONCLUSION. — Les deux globulines du plasma sanguin normal n'ont pas les propriétés des ferments oxydants.

Devons-nous donc supposer qu'au moment de la coagulation du sang, c'est-à-dire au moment de la décomposition du fibrinogène et de la formation de la fibrine le ferment oxydant soit produit ?

A *priori*, il semble bien inadmissible que la fibrine possède une propriété oxydante absente dans le fibrinogène.

Faisons cependant une expérience à ce sujet.

Le 3 août 1897, on reçoit de la fémorale d'un Chien 1 litre de sang dans un vase contenant 2 grammes d'oxalate de sodium. Le sang est immédiatement centrifugé. Au bout de trois heures, le plasma est d'une limpidité parfaite.

On ajoute alors dans les tubes de la centrifuge du chlorure de calcium (4 gouttes de la solution de CaCl_2 à 10 0/0 par 10 centimètres cubes de sang).

La coagulation se produit rapidement et au bout d'un quart d'heure on peut retirer du tube un cylindre de fibrine. On prend les parties supérieures et moyennes de cylindre, celles qui ne sont pas en rapport avec la couche des globules blancs et on la place à 40° dans le fluorure de sodium à 2 0/0.

A plusieurs reprises, les jours suivants on procède à l'examen du

(1) Nous avons obtenu quelquefois une légère teinte verdâtre fugace. Le fait sera interprété ultérieurement.

liquide ainsi obtenu qui ne donne aucune réaction avec la teinture de gaïac avant ou après filtration.

Une autre expérience, qui n'est que la répétition de la précédente avec cette différence qu'après l'addition de CaCl_2 on centrifuge de nouveau pour hâter la rétraction du caillot, donne exactement le même résultat.

CONCLUSION. — Ni la sérumglobuline, ni le fibrinogène, ni la fibrine ne possèdent les propriétés des ferments oxydants.

2° L'oxydase est-elle localisée dans le stroma du globule rouge ?

A priori cela n'est pas probable, puisque nous avons constaté la présence de l'oxydase dans le sang de beaucoup d'invertébrés qui ne possèdent pas de globules rouges.

EXPÉRIENCE. — Sang de Chien oxalaté à 2 0/00 au sortir de la fémorale. Centrifugation.

On décante le plasma, la couche des leucocytes et la couche supérieure des globules rouges. On obtient ainsi un volume de 190 centimètres cubes de globules. On laque en additionnant de 570 centimètres cubes d'eau distillée à 30°. On centrifuge de nouveau après avoir additionné d'une petite quantité d'alcool pour hâter la précipitation des stromas des globules.

Après centrifugation, on décante l'eau chargée d'hémoglobine et on trouve au fond des tubes un magma constitué par les stromas des globules rouges.

Le magma est encore assez fortement teinté d'hémoglobine. On verse sur ce précipité avec précaution au moyen d'une pipette de l'eau distillée alcoolisée à 5 0/0 ; on laisse quelques minutes en contact et après avoir filtré, on obtient un liquide à peine teinté par l'hémoglobine.

Le liquide traité par la teinture de gaïac donne une coloration bleue très intense.

Il semble donc que ce résultat donne tort à nos prévisions. Mais en examinant la surface du précipité, on voit des trainées blanches qui, examinées au microscope, se montrent constituées par des leucocytes qui avaient été entraînés au milieu des globules rouges lors de la première centrifugation (1) et qui n'ont pas été détruits par le lavage du sang.

Au moyen d'un pinceau et de plusieurs lavages successifs à l'eau alcoolisée, on enlève toute trace de leucocytes ; on constate alors que l'eau alcoolisée à 5 0/0, laissée en contact quelques instants avec les stromas des globules rouges ne donne plus aucune réaction par la teinture de gaïac.

3° L'oxydase est-elle localisée dans le leucocyte ?

L'expérience précédente permet déjà de penser qu'il en est en effet ainsi. Les expériences suivantes prouvent ce fait d'une façon certaine.

(1) Il ne faudrait pas croire que la séparation des différents éléments du sang par la centrifugation soit aussi nette qu'on l'indique d'ordinaire : plasma, zone des globules blancs et zone des globules rouges. Après avoir centrifugé du sang, décanté le plasma, la zone des leucocytes et la zone supérieure des globules rouges, si on reprend les globules rouges qui restent par 2 volumes de NaCl à 3 0/0, et qu'on centrifuge de nouveau, on obtient sur les globules rouges une nouvelle couche de leucocytes presque aussi épaisse qu'à la première centrifugation. Ce sont ces derniers leucocytes que nous retrouvons sur nos stromas de globules rouges.

EXPÉRIENCE I. — 18 janvier 1897.

Sang de chien oxalaté à 2 0/0 au sortir de la fémorale. On centrifuge ce sang pendant 2 heures. On décante le plasma avec précaution jusqu'à la zone des leucocytes, et on verse lentement avec une pipette une couche d'eau chloroformée sur les leucocytes.

Après une demi-heure de contact, on reprend cette eau chloroformée qui donne avec la teinture de gaïac une réaction assez nette, mais moins nette cependant que les solutions de fibrine dans les sels neutres.

Nous attribuons notre insuccès relatif à ce fait qu'il est impossible d'enlever entièrement le plasma qui recouvre la couche des leucocytes sans désagréger cette couche. Le plasma qui contient des substances réductrices vient se mélanger à l'eau chloroformée et masque ensuite les réactions de l'oxydase.

Nous avons donc repris cette expérience sous une nouvelle forme.

2^e SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — On procède comme dans l'expérience de la page 55.

Sang oxalaté à 2 0/0 à la sortie de la fémorale du chien. Centrifugation. Addition de chlorure de calcium à 10 0/0 (4 gouttes par 10 cc. de sang) (1).

Au bout de quelques minutes, le plasma se prend en une gelée qui rapidement acquiert une consistance ferme. On remet alors les tubes à la centrifuge.

Quand on les retire au bout d'une demi-heure, le caillot s'est considérablement rétracté en expulsant un sérum limpide. Il est alors facile d'enlever ce caillot et de décanter le sérum.

(1) Des expériences préliminaires nous avaient appris que c'est là la quantité de CaCl_2 qui amène la coagulation la plus rapide et qui fournit le caillot le plus rétractile.

La zone des leucocytes se présente sous la forme d'une rondelle qui a acquis une certaine consistance et qui peut être prise avec des pinces sur la zone des globules rouges. Avec un pinceau, on débarrasse ce petit gâteau leucocytaire des globules rouges qui adhèrent à sa face inférieure.

Ayant ainsi consolidé et isolé la couche des leucocytes de toutes les autres parties du sang, on peut la traiter de différentes façons pour en extraire l'oxydase qu'elle contient.

EXPÉRIENCE 1. — La zone leucocytaire est placée dans une petite quantité de fluorure de sodium à 2 0/0 ; on agite vigoureusement de façon à fragmenter la rondelle composée de globules blancs et on met à l'étuve à 40°. Au bout de 2 heures de séjour à l'étuve, on filtre une portion de la liqueur. Ce liquide filtré donne une réaction très nette avec la teinture de gaïac. Bouilli, il ne donne plus la réaction.

Le lendemain, on filtre une autre portion de la macération dans le NaFl, on obtient les mêmes résultats.

EXPÉRIENCE 2. — Répétition de l'expérience précédente. Mêmes résultats.

La teinture de gaïac qui servait de réactif a été préparée le jour même.

EXPÉRIENCE 3. — La zone des leucocytes est placée dans un petit flacon contenant :

NaFl à 2 0/0. 20 cc.

Trypsine (solution glycinée) 5 »

On met à l'étuve à 40°.

Le lendemain, on filtre quelques centimètres cubes de cette digestion qui fournit une réaction très intense avec la teinture de gaïac (préparée le jour même).

Le liquide bouilli ne donne plus aucune réaction. 24 heures après, nouvel examen et mêmes résultats.

EXPÉRIENCE 4. — Répétition de l'expérience précédente. Résultats identiques.

EXPÉRIENCE 5. — L'expérience est disposée de la même façon, mais on diminue un peu la quantité de solution de trypsine.

On met à l'étuve à 40° la zone des leucocytes dans un flacon contenant :

Trypsine (solution glycinée) 2 cc. 5

NaFl à 20/0 20 »

Le lendemain, le liquide filtré donne avec la teinture de gaïac préparée le jour même une réaction aussi nette que celle qu'on obtient avec une solution très active de la laccase de G. Bertrand.

24 heures après nouvel examen, même résultat.

Le liquide bouilli ne donne plus aucune réaction.

Le résidu de la digestion qui a été retenu par le filtre est traité par la teinture de gaïac, il donne une réaction très nette.

CONCLUSION. — De toutes ces expériences, il résulte que :

1° Les leucocytes du sang contiennent une oxydase ;

2° Tous les autres éléments du sang (matières albuminoïdes, stroma des globules rouges) ne contiennent pas d'oxydase.

L'oxydase des leucocytes peut être extraite lorsqu'on fait des macérations de ces éléments dans l'eau chloroformée ou dans le fluorure de sodium à 20/0 ; ou mieux encore lorsqu'on fait des digestions de ces éléments par la trypsine.

Il nous est facile maintenant de comprendre comment la fibrine qui provient du battage du sang fournit des solutions qui possèdent des propriétés des ferments oxydants.

Au moment où le sang sort du vaisseau, quelques leucocytes sont détruits et mettent en liberté le fibrin-ferment qui permet à la fibrine de se former. Les autres leucocytes ne tardent pas à se détruire au milieu des filaments de

fibrine lorsque celle-ci est restée exposée à l'air pendant quelques instants. Tous ces leucocytes en se détruisant ainsi spontanément mettent en liberté leur oxydase ; la fibrine s'en imprègne, lorsqu'ensuite cette fibrine est solubilisée ou digérée, le ferment oxydant passe en solution.

Ces faits nous permettent également de comprendre comment les globulines précipitées du plasma oxalaté par saturation avec le sulfate de magnésie possèdent quelquefois un pouvoir oxydant (très faible à la vérité). La faible quantité d'oxydase qu'elles contiennent ne leur appartient pas en propre, mais provient des quelques leucocytes qui se sont détruits.

Ainsi se trouve expliqué le fait signalé en note à la page 55.

La même explication convient pour l'oxydase qu'on peut extraire des organes. Mais nous reviendrons ultérieurement sur ce sujet.

CHAPITRE X

L'oxydase existe-t-elle dans le sang circulant ou dans les tissus de l'animal vivant ?

A priori, la réponse est négative puisque nous venons de voir que, dans le sang oxalaté, presque toute l'oxydase reste fixée au leucocyte et n'en est extraite que par la macération ou la digestion de celui-ci.

Des expériences directes ont été faites déjà pour déterminer l'action oxydante ou réductrice du sang ou des divers tissus.

C'est ainsi qu'Ehrlich (1) en injectant dans le sang du bleu d'alizarine ou de céruléine a pu constater que le sérum du sang s'était coloré en bleu tandis que le parenchyme de certains organes, le foie par exemple, avaient décoloré le réactif indiquant par là un pouvoir réducteur énergique.

Cette expérience, du reste, ne nous permet de tirer aucune conclusion au sujet de la présence ou de l'absence de l'oxydase dans le sang circulant puisque la coloration bleue du sérum indique que les colorants employés n'ont pas subi d'action réductrice, elle n'indique pas qu'il y a eu oxydation.

Il en est de même de l'expérience de Röhmman et

(1) EHRLICH cité par GAUTIER, *Chimie de la cellule vivante*, p. 88.

Spitzer (1) qui, injectant dans une veine un mélange de paraphénylendiamine et de naphtol, constatent la formation d'indophénol. Nous avons constaté, en effet, que ce mélange en milieu alcalin et à la température de 37-40° se transforme spontanément en peu de temps.

Nous avons donc repris l'étude de cette question en employant les réactifs qui nous ont déjà servi à reconnaître la présence des oxydases et en nous adressant surtout aux invertébrés chez lesquels la présence d'un pigment comme l'hémoglobine ne vient pas masquer les changements de coloration des réactifs des oxydases. Déjà en recherchant la présence de l'oxydase dans les différents tissus des invertébrés, nous avons pu faire certaines remarques au point de vue auquel nous nous plaçons en ce moment.

C'est ainsi que chez les Acéphales, si on sectionne une branchie chez un animal bien vivant, et qu'on plonge immédiatement cet organe dans de la teinture de gaïac ou dans ce réactif additionné de quelques gouttes d'eau, on ne voit pas la réaction se produire instantanément. Ce n'est qu'au bout de quelques instants qu'on voit des traînées bleues se produire, elles augmentent ensuite rapidement. Si on prend la branchie qui vient de servir à cette expérience et qu'on la plonge dans une autre quantité de teinture de gaïac additionnée d'eau, la réaction se produit cette fois instantanément.

De même, si après avoir coupé une branchie on la laisse un quart d'heure à la température du laboratoire dans une

(1) RÖHMANN et SPITZER, Ueber Oxydationswirkungen thierischer Gewebe. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, XXVIII, p. 567.

petite capsule de porcelaine ou mieux si on place la capsule sur un bain-marie à 50° en humectant la branchie avec quelques gouttes d'eau afin qu'elle ne se dessèche pas, on voit la réaction se produire instantanément lorsqu'on laisse tomber quelques gouttes de teinture sur cette branchie.

M. Piéri et moi, nous avons fait des remarques analogues dans les très nombreuses expériences que nous avons faites à Roscoff sur les invertébrés marins.

Ces expériences sont en particulier très faciles à répéter avec la Patelle à cause de la forme de sa coquille.

On enlève rapidement l'animal de sa coquille en laissant adhérer après celle-ci une portion du manteau. Si on verse alors de suite quelques gouttes de teinture de gaïac, la coloration bleue ne se produit qu'au bout de 5, 10 minutes et quelquefois pas du tout. Au contraire une nouvelle addition du même réactif au bout de quelques minutes donne une coloration bleue instantanée.

La réaction se produit aussi de suite et avec beaucoup d'intensité lorsqu'après avoir enlevé l'animal de sa coquille on attend 5 ou 10 minutes avant d'ajouter la teinture de gaïac.

Tout se passe donc dans ces expériences comme si le ferment oxydant n'existait pas tout formé dans le sang ou la cellule vivante, mais comme s'il était produit par la destruction spontanée de certaines cellules qui sont sans doute, pour les raisons que nous avons données et pour celles que nous donnerons ultérieurement, les leucocytes du sang et des tissus.

INJECTIONS DE TEINTURE DE GAIAC DANS LE SANG, LA
CAVITÉ GÉNÉRALE OU LES TISSUS DES INVERTÉBRÉS.

Pour ces expériences, nous avons employé : Soit une solution concentrée de résine de gaïac (préparée au chloroforme) dans l'alcool à 65° ;

Soit une émulsion obtenue en mélangeant une partie de la teinture précédente avec 4 parties de chlorure de sodium à 7 p. 1000.

Pour abrégér la relation de nos expériences, nous désignerons ce dernier réactif sous le nom d'émulsion de gaïac.

Nous avons employé ce dernier réactif parce qu'il ne contient que de l'alcool très dilué qui ne détruit pas les cellules des tissus dans lesquelles on l'injecte et n'a pas l'inconvénient de précipiter par son contact l'oxydase qu'on cherche à mettre en évidence.

EXPÉRIENCES SUR LES ACÉPHALES. — On remplit un petit tube de verre terminé par une pointe très effilée d'émulsion de gaïac. On introduit la pointe du tube entre les deux lames d'une branchie d'*Anodonta cygnea* et on injecte environ 1/4 de centimètre cube d'émulsion qui pénètre entre les lames branchiales et tranche par son ton mat sur le reste de la branchie.

Les trainées blanches ainsi formées restent incolores. On place l'*Anodonte* dans un peu d'eau et on constate le lendemain que l'animal est toujours bien vivant, mais que la résine de gaïac contenue dans les vaisseaux de la branchie n'a pas pris de teinte bleue.

Il en est de même encore les jours suivants.

On recommence plusieurs fois l'expérience avec le même résultat quelle que soit la région de l'animal dans laquelle on injecte l'émulsion.

En faisant une injection dans le pied de l'*Anodonte* et en laissant en place le tube fixé dans l'organe par sa pointe effilée, on voit le lendemain que la petite quantité d'émulsion de gaïac qui était restée dans le tube a viré au bleu.

En examinant le contenu du tube, on trouve mélangés aux granules de résine de gaïac de nombreux leucocytes dont beaucoup sont morts ou en voie de désagrégation ; c'est surtout les dernières gouttes qui s'écoulent du tube, par conséquent, celles qui étaient dans le tube en contact avec l'air libre qui sont en voie de destruction. C'est précisément cette couche aussi qui présentait la teinte bleue la plus nette.

Ainsi la résine de gaïac n'a pas été oxydée dans le sang de l'animal vivant ou au milieu de ses tissus. Au contraire, elle a été oxydée à l'air libre ou dans un liquide en contact avec l'atmosphère, liquide dans lequel se trouvaient de nombreux leucocytes dont beaucoup étaient en voie de destruction.

EXPÉRIENCES SUR LES GASTÉROPODES. — Les expériences que nous décrivons avaient été entreprises non seulement dans le but de savoir si l'oxydase existait dans le sang et les tissus de l'animal vivant, ce qui nous semblait peu admissible, mais aussi dans le but d'obtenir l'ingestion, la phagocytose des granules de résine de gaïac par les leucocytes.

Nous espérons pouvoir décider ainsi par une réaction microchimique si l'oxydase existait à l'intérieur du leucocyte vivant.

Jamais, en opérant comme nous l'avons dit, nous n'avons pu constater à l'intérieur des leucocytes des Acéphales des particules de résine de gaïac incolores et d'autres bleues. Pensant que l'absence de phagocytose des grains de gaïac pouvait tenir à ce que l'émulsion employée contenait une certaine quantité d'alcool qui devait exercer sur le leucocyte un chimiotactisme négatif, nous avons opéré de la manière suivante dans ces nouvelles expériences :

La teinture de gaïac (solution saturée de résine au chloroforme dans l'alcool à 70°) est dialysée pendant plusieurs jours en présence d'une grande quantité d'eau fréquemment renouvelée. L'alcool est

ainsi complètement éliminé et on obtient une émulsion de résine de gaïac composée de granules très fins en suspension dans l'eau.

A la vérité, le réactif ainsi obtenu est beaucoup moins sensible que la teinture ou l'émulsion employée dans les autres expériences. Le virage au bleu ne se produit par une solution très active de laccase qu'au bout d'un temps assez long. Les résultats positifs obtenus n'en seront donc que plus probants.

EXPÉRIENCES SUR PHILINE APERTA. — Ce gastéropode est le meilleur sujet d'étude que nous ayons trouvé pour les expériences présentes.

Les téguments sont en effet très transparents, aussi les modifications de coloration qui se passent dans la cavité générale ou dans l'épaisseur des téguments sont-elles facilement perçues sans qu'on ait besoin d'ouvrir l'animal.

EXPÉRIENCE I (Roscoff, 11 août 1897). — Elle a pour but de décider si dans les tissus, dans le sang ou même à l'intérieur des leucocytes de *Philine aperta* se trouvent des substances capables de réduire l'acide gaïaconique oxydé, de décolorer la résine de gaïac qui a bleui sous l'influence de l'oxydase.

On comprend en effet, que s'il en était ainsi, les résultats négatifs obtenus ne prouveraient pas l'absence d'oxydase.

On ajoute quelques gouttes d'une solution très énergique de laccase à de la teinture de gaïac. Il se produit aussitôt une coloration bleue très intense. On fait dialyser comme il a été dit précédemment, et on obtient une émulsion de résine de gaïac d'un bleu très vif.

Au moyen d'une seringue de Pravaz, on injecte 1/4 de cent. cube de cette solution dans le pied et dans la cavité générale d'une *Philine aperta*.

On voit par transparence la cavité générale qui est colorée en bleu et quelques plaques de la même couleur dans l'épaisseur du pied.

L'animal est remis dans un bac dans l'eau courante.

Le lendemain 12 août, on voit à travers les téguments que la teinte bleue est moins généralement répandue dans la cavité générale, que les plaques bleues du pied sont moins intenses.

L'animal est ouvert (1) et nous voyons au premier coup d'œil que l'organe phagocytaire (situé dans cette espèce près du cœur et en avant du foie) est d'un bleu intense qui le détache avec une netteté absolue des tissus environnants.

On aperçoit aussi quelques traînées bleues dans la cavité générale. Détachées avec la pointe du scalpel et examinées au microscope, ces traînées bleues se montrent constituées par des amas de leucocytes.

Ces leucocytes sont bourrés de granulations de gaïac d'un bleu intense. Ce fait est constaté à plusieurs reprises au moyen de plusieurs préparations faites successivement. Il semble même que tous les granules de résine aient été englobés par les phagocytes, car on n'en trouve plus de libres dans la cavité générale.

On détache un lambeau de l'organe phagocytaire, et, en le dissociant sur une lame, on le voit constitué par de grandes cellules oblongues qui toutes sont remplies de granulations bleues.

CONCLUSION. — Cette expérience nous apprend que les leucocytes et les cellules de l'organe phagocytaire absorbent les grains de résine de gaïac bleuis par l'oxydase et ne décolorent pas ces particules, ne réduisent pas l'acide gaïaconique oxydé.

EXPÉRIENCE II (Roscoff, 12 août 1897). — Au moyen d'une seringue de Pravaz, on injecte dans les tissus du pied d'une *Philine aperta* 1/2 cent. cube d'émulsion de résine de gaïac privée d'alcool comme précédemment par la dialyse (mais non bleuie par l'addition de laccase).

Le lendemain, l'animal ne présente aucune teinte bleue.

Le 14, on trouve la *Philine* morte dans le bac.

On remarque plusieurs taches bleues très petites dans la région la plus superficielle des téguments.

(1) M. Cuén ot, dont tout le monde connaît la grande compétence et les belles recherches dans ces questions de phagocytose et d'organes phagocytaires, a bien voulu nous donner de très utiles indications au cours de ces expériences. Nous lui adressons nos très sincères remerciements.

On sort l'animal de l'eau et on le laisse dans un cristalliseur sur une table du laboratoire. Au bout d'une demi-heure, on constate que le nombre et l'étendue des taches bleues ont beaucoup augmenté.

On détache au moyen de ciseaux quelques fragments très minces des téguments, et on voit que ceux-ci sont remplis de granulations de gaïac réunies en amas. On constate de la façon la plus évidente que ces granulations n'ont pas été englobées par les nombreux leucocytes qui existent dans leur voisinage.

CONCLUSION. — Les granules de résine de gaïac sont restés incolores, l'acide gaïaconique n'a pas été oxydé tant que l'animal a été vivant ; après la mort de l'animal, les leucocytes qui entouraient les granulations se sont détruits, et, par leur mort, leur destruction, ont mis en liberté le ferment oxydant ; ce ferment dans les couches les plus superficielles du tégument au contact de l'air a pu oxyder la résine, d'où le bleuissement observé dans cette région.

EXPÉRIENCE III (Roscoff, 13 août 1897).— C'est à peu près la répétition de l'expérience précédente.

Injection d'un demi-centimètre cube d'émulsion de résine de gaïac (privée d'alcool par dialyse) dans le pied et la cavité générale d'un exemplaire de grande taille de *Philine aperta*.

On replace l'animal dans le bac. Aucune tache bleue ne paraît dans ses téguments ou sa cavité générale.

Le lendemain on trouve l'animal mort. A ce moment, il ne présente toujours pas la moindre tache bleue.

On retire l'animal du bac et on l'ouvre pour examiner l'organe phagocytaire. On le trouve incolore. Il est impossible également de découvrir aucune particule de résine de gaïac oxydée dans la cavité générale.

On laisse l'animal sur le liège de la cuvette à dissection en prenant les précautions nécessaires pour qu'il ne se dessèche pas.

Quatres heures après, on remarque plusieurs taches bleues très

intenses dans la zone superficielle des téguments à la partie antérieure du corps et une autre un peu moins nette et un peu diffuse dans la masse viscérale près de l'organe phagocytaire (1).

Un examen microscopique prouve que les granulations bleues ont été englobées par les phagocytes.

Le lendemain (24 heures après que l'animal a été retiré du bac et laissé dans la cuvette à dissection sous de l'ouate mouillée), la Philine présente de très nombreuses taches bleues répandues dans les téguments.

Quelques-unes de ces taches bleues dissociées sur une lame et examinées au microscope montrent des leucocytes renfermant à leur intérieur des granulations bleues. Il est impossible de voir d'une façon évidente si d'autres leucocytes renferment à leur intérieur des granulations non colorées, mais il semble bien que non, car on voit de nombreuses granulations incolores en dehors des leucocytes, aucune à l'intérieur.

CONCLUSION. — L'interprétation de cette nouvelle expérience est pour nous à peu près la même que celle de la précédente, à savoir :

Absence d'oxydase dans les tissus et le sang de l'animal vivant. Production d'oxydase par la mort et la destruction dans un milieu oxygéné des leucocytes. A ce moment la résine de gaïac est oxydée, colorée en bleu. Il semble bien que c'est seulement lorsque les granules ont été oxydés, ont bleui qu'ils sont englobés par certains leucocytes restés vivants.

EXPÉRIENCES SUR LES INSECTES. — Nos expériences ont porté surtout sur les Orthoptères. Nous avons choisi ce

(1) L'animal est resté ouvert et ces organes sont en rapport avec l'oxygène atmosphérique.

groupe à cause des animaux de grande taille qu'il était facile de nous procurer et aussi à cause des très beaux organes phagocytaires que ces insectes possèdent.

Ces organes sont, comme on sait, disposés en une bande longitudinale sur les côtés du vaisseau dorsal.

Chez *Ephippium vici* en faisant une injection de carmin en suspension dans l'eau distillée dans la cavité générale de l'insecte au moyen d'une seringue de Pravaz, et en ouvrant l'animal quelques heures après, on trouve une large bande rouge qui occupe les côtés du vaisseau dorsal. En même temps on constate que de très nombreux leucocytes contiennent à leur intérieur des grains de carmin.

Rappelons que nos premières expériences sur la présence de l'oxydase chez les insectes nous ont conduits aux résultats suivants :

On ouvre un insecte suivant la ligne du vaisseau dorsal, on laisse tomber immédiatement quelques gouttes de teinture de gaïac dans la cavité générale, il ne se produit aucune coloration bleue en général quel que soit le temps écoulé. Si après avoir attendu une dizaine de minutes, on ajoute de nouveau quelques gouttes de réactif, on obtient un bleuissement immédiat.

On obtient un résultat encore plus net en procédant ainsi :

L'insecte est largement ouvert comme précédemment, on le laisse en cet état en contact avec l'air atmosphérique pendant 1/4 d'heure environ ; alors seulement on laisse tomber quelques gouttes du réactif dans la cavité générale, et on voit un bleuissement immédiat et intense se produire surtout dans les parties déclives où le sang s'est accumulé.

AUTRE EXPÉRIENCE. — On provoque l'autotomie d'une des pattes postérieures de l'*Ephippium viciu*m. On laisse s'écouler 2 ou 3 gouttes de sang qui, après un séjour de quelques minutes à l'air libre, donnent une réaction nette avec la teinture de gaïac. On introduit alors par la section de la patte autotomisée l'aiguille d'une seringue de Pravaz au moyen de laquelle on injecte quelques gouttes de teinture de gaïac dans la cavité générale. On maintient la seringue en place pendant quelques instants, puis on l'enlève et on laisse s'écouler quelques gouttes de sang mélangé à la teinture de gaïac. On constate que le réactif n'a pas bleui et que la réaction ne se produit pas dans le liquide qui s'est écoulé.

On ouvre l'animal, aucune trace de coloration bleue sur les différents organes ou dans les parties déclives.

Après que l'*Ephippium* est resté ouvert à l'air quelques instants, on recommence la réaction qui réussit très bien.

CONCLUSION. — Ces différentes expériences conduisent toujours à la conclusion déjà formulée : L'oxydase n'existe pas chez l'animal vivant, elle semble provenir de la destruction spontanée des leucocytes.

Les injections d'émulsion de gaïac préparées comme il a été dit à la page 65 ne nous ont donné aussi que des résultats négatifs au point de vue de la présence d'une oxydase dans les tissus de l'animal vivant.

On procédait de la façon suivante :

On provoquait l'autotomie d'une patte postérieure de l'*Ephippium*, on recouvrait aussitôt d'une solution de gélatine la section du moignon et, à travers cette couche de gélatine encore molle, on introduisait l'aiguille de la seringue de Pravaz, et on injectait quelques gouttes d'émulsion dans la cavité générale.

On ouvrait l'insecte le lendemain de l'injection ou quelques jours après. Jamais l'organe phagocytaire ni aucune autre partie du corps ne nous ont montré de teinte bleue. En dissociant une portion des tissus qui correspond à l'organe phagocytaire, on trouvait de nombreux granules de résine de gaïac *entre* les cellules, mais jamais nous n'avons pu constater l'englobement de ces granules par les cellules de l'organe phagocytaire ou par les phagocytes de la cavité générale.

Dans le but de voir si le leucocyte vivant pouvait sécréter une oxydase, nous avons injecté aussi des particules très fines (talc, farine...,) imprégnées de la solution d'hydroquinone ou de celle de gaïacol.

Nous avons encore retrouvé ces particules dans la cavité générale ou entre les cellules de l'organe phagocytaire mais jamais à l'intérieur des cellules.

Il semble que vis-à-vis de ces substances réductrices (gaïac non oxydé, hydroquinone, gaïacol) les leucocytes manifestent une chimiotaxie négative.

CONCLUSION. — A la question que nous nous étions posée au début de ce chapitre, nous pouvons maintenant répondre :

L'oxydase n'existe ni dans le sang circulant, ni dans les tissus de l'animal vivant.

Toutes les expériences s'accordent au contraire à prouver que l'oxydase est mise en liberté par le leucocyte au moment de sa destruction.

J'ajoute que si mon attention a été attirée sur ces faits, si

ces interprétations des expériences précédentes se sont présentées à mon esprit, c'est grâce à l'enseignement de mon maître, M. le Professeur Dastre, auquel j'ai souvent entendu émettre l'opinion que d'une façon générale le ferment soluble prenait naissance par la destruction, la désintégration de la cellule vivante.

CHAPITRE XI

L'oxydase des animaux provient-elle toujours de la destruction des leucocytes ?

Nous venons de démontrer qu'il en est ainsi dans le sang des mammifères : dans ce cas, grâce à la mobilité des éléments, en employant la force centrifuge, nous avons pu isoler le plasma des globules et séparer les différentes sortes de globules. Il est évident que, dans un tissu donné, nous n'avons aucun moyen de séparer les leucocytes des autres éléments anatomiques. Pour nous assurer que le leucocyte seul produit le ferment oxydant, il nous faudrait un réactif microchimique que nous ne possédons pas encore.

Il nous est donc impossible de montrer que l'oxydase provient uniquement de la destruction des leucocytes.

Mais nous pouvons et nous devons rechercher si partout où l'oxydase a été rencontrée jusqu'à présent dans les tissus animaux sa présence peut s'expliquer par la destruction des leucocytes.

Rappelons donc brièvement les organes des différents animaux dans lesquels nous avons pu déceler la présence d'une oxydase (1).

1° *Cœlentérés*. — Sécrétion muqueuse des téguments et surtout de la base des tentacules.

(1) Les mots en caractères italiques indiquent les organes où l'oxydase a été signalée d'une façon particulièrement nette.

- 2° Échinodermes. — Sang et membrane péri-buccale.
- 3° Vers. — Sang et branchie.
- 4° Crustacés. — Sang. *Fibrine*.
- 5° Insectes. — Sang.
- 6° Acéphales. — *Branchies*. Sang.
- 7° Gastéropodes. — Manteau. Sang.
- 8° Céphalopodes. Sang. *Fibrine*.
- 9 Tuniciers. — Manteau.
- 10° Vertébrés. — *Leucocytes*. *Fibrine* provenant du *bat-tage du sang*. Rate. *Bile*.

Nous n'avons pas de remarque particulière à faire sur les 5 premiers groupes. Partout où une oxydase a été mise en évidence (oxydase peu active dans les 3 premiers groupes) on constate la présence de cellules migratrices, de leucocytes dont un certain nombre se sont spontanément détruites ou se détruisent par les macérations ou au cours des manipulations auxquelles on soumet les organes pour constater la présence du ferment oxydant.

6° ACÉPHALES.

Nous avons constaté dans les branchies de ces mollusques la présence d'une oxydase très active, c'est un des résultats les plus nets que nous ayons. Or, les branchies et les palpes contiennent un très grand nombre de leucocytes et, fait qui vient bien à l'appui de l'opinion que nous soutenons, il se produit constamment une diapédèse de ces leucocytes à travers l'épithélium ; arrivés à l'air libre, ces leucocytes, dont beaucoup renferment à leur intérieur des corps étrangers, se détruisent spontanément. L'auteur qui

a découvert ce fait intéressant, M. de Bruyne (1), considère cette émigration comme une véritable excrétion.

Sans que nous insistions davantage, on voit combien cette observation rend compte des circonstances dans lesquelles nous avons obtenu nos réactions les plus nettes. (Chauffage progressif sur un bain-marie, etc.).

9° TUNICIERS.

Nous avons trouvé une oxydase très facile à mettre en évidence dans la tunique des ascidies. Or, à première vue, il semble bien improbable qu'on puisse rencontrer des leucocytes en grand nombre dans cette enveloppe de cellulose, et j'avoue qu'en faisant des injections de poudre colorée (carmin, encre de Chine) dans cette cuticule, j'avais peu d'espoir de la voir absorbée par des phagocytes.

Le résultat fut cependant très net. Le fait était déjà connu du reste, et je ne puis mieux faire que d'invoquer à ce sujet la grande autorité de M. Metchnikoff (2).

« Composée d'une substance cellulosique, cette tunique, souvent très épaisse, renferme un *très grand nombre* de cellules amiboïdes munies d'appendices mobiles. Les dernières recherches de M. A. Kowalesky (3) ont démontré qu'en réalité, les cellules de la tunique des ascidi-

(1) DE BRUYNE, Contribution à l'étude de la phagocytose. *Arch. biol.*, XIV, 161.

(2) E. METCHNIKOFF, *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*. Paris, Masson, 1892, p. 94.

(3) A. KOWALESKY, *Mémoires de la Société des naturalistes de St-Petersbourg*, novembre 1890 (en russe).

dies n'étaient autre chose que des leucocytes immigrés à travers les parois épidermiques de l'animal.

« L'introduction d'échardes dans la tunique des ascidies provoque une agglomération de ces phagocytes, produisant ainsi une sorte d'infiltration de la tunique. »

Ainsi, le fait est incontestable, la tunique des ascidies renferme un grand nombre de leucocytes. On s'explique dès lors facilement comment la macération d'un manteau d'ascidie haché dans l'eau chloroformée fournit une solution si active et si pauvre relativement en matières albuminoïdes. Les leucocytes seuls se détruisent dans l'eau chloroformée et mettent leur oxydase en liberté, le reste du tissu reste inattaqué puisqu'il est composé de cellulose. Et l'oxydase est d'autant plus facile à mettre en évidence que le liquide ne contient aucune substance réductrice.

Au moyen d'une seringue de Pravaz, nous avons fait des injections de teinture de gaïac ou d'émulsion de gaïac dans le manteau des ascidies. Par ce moyen, on peut obtenir dans un territoire assez étendu une injection très nette des canalicules qui cheminent dans la cuticule. Les granules de résine de gaïac pénètrent dans les plus fines ramifications qui se terminent en un bouquet de canalicules très ténus. Tous les canaux injectés tranchent d'abord sur le reste de la cuticule transparente par leur couleur blanche opaque. Si, après avoir fermé par une goutte de gélatine le trou produit par la piqûre de l'aiguille, on replace l'ascidie dans l'eau, on ne tarde pas à voir les granules de résine passer au bleu ; les grains qui

bleuissent les premiers sont ceux qui sont compris dans le conduit creusé par l'aiguille, conduit relativement volumineux dans lequel débouchent nombre de fins canalicules de la cuticule qui y déversent des leucocytes.

L'oxydase de la tunique des ascidies provient donc encore de la destruction des nombreux leucocytes contenus dans ce tissu.

10° VERTÉBRÉS.

Nous ne reviendrons pas sur ce que nous avons dit au sujet de l'oxydase du sang. Nous n'examinerons pas non plus les différents tissus ou organes dont on a pu extraire l'oxydase puisque tous contiennent des leucocytes ; nous ferons seulement remarquer que la rate qui, après la fibrine, a donné à MM. Abelous et Biarnès les résultats les plus nets, est précisément l'organe qui est extrêmement riche en leucocytes.

Passons à l'oxydase de la bile.

Nous avons vu (page 46) que MM. Dastre et Floresco admettaient (avec quelques réserves) l'existence dans la bile d'une oxydase capable de transformer la bile jaune en bile verte. Nous avons reproduit les faits qui plaident en faveur de l'existence de cette oxydase.

Quel est le lieu où la bile jaune se transforme en bile verte ?

Voici à ce sujet ce que disent MM. Dastre et Floresco (p. 742) (1) :

« Est-ce dès la cellule hépatique et les canaux biliaires,

(1) DASTRE et FLORESCO, Origine dans la bile des pigments biliaires biliprasiniques jaune et vert. *Archives de physiologie*, 1897, p. 737.

au moment même de la formation de la bile? On serait porté à le croire parce que les conditions d'oxydation qui président au fonctionnement hépatique ont encore là toute leur activité. Il est possible que ce soit plus loin, dans la vésicule biliaire; mais là les conditions d'oxydation sont infiniment moins favorables. »

Et plus loin, page 745 :

« Il est possible que l'oxydation avec hydratation du pigment originel, fondamental, la bilirubine, commence dès la cellule hépatique et les canaux biliaires. Dans tous les cas, elle se poursuit dans la vésicule. Or, les conditions artificielles de cette transformation (oxygène, lumière, chaleur) n'y sont pas réalisées. De là l'hypothèse d'un *agent* ou *condition* d'oxydation particulière (oxydasé hépatique). »

J'ai tenu à citer ces quelques lignes car elles donnent bien l'impression que MM. Dastre et Floresco ont été frappés par ce fait paradoxal : on admet l'existence d'une oxydase hépatique, oxydase sans doute très énergique puisque c'est elle qui doit présider à l'oxydation des albuminoïdes et à la formation de l'urée; or la bilirubine au sortir de la cellule hépatique, au moment où elle est encore au contact de cette oxydase n'est pas transformée, ce n'est que plus loin, dans la vésicule, que se forment les pigments plus oxygénés, biliprasine et biliverdine. Cela paraît d'autant plus inexplicable qu'une solution de laccase ou de bile verte (c'est-à-dire chargée d'oxydase) transforme presque instantanément une assez grande quantité de bile jaune en bile verte.

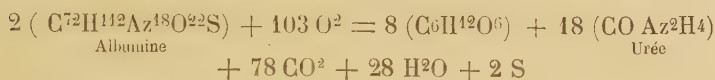
Voyons donc si nous pouvons expliquer ces contradic-

tions et si l'oxydase de la bile a encore pour origine le leucocyte.

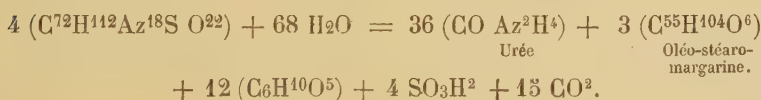
Et d'abord y a-t-il une oxydase hépatique ? La formation de l'urée dans le foie peut s'expliquer de deux façons :

1° Par une oxydation. C'est la théorie classique universellement admise jusqu'en ces dernières années.

Dans cette hypothèse, on peut concevoir que les choses se passent de la façon qu'indique l'équation suivante (1) :



2° Par un dédoublement accompagné d'hydratation, sans intervention directe de l'oxygène. C'est la théorie émise par M. Gautier (2). L'équation suivante rend compte de la façon dont les phénomènes peuvent se passer dans ce cas :



L'expérience suivante due à M. Ch. Richet (3) confirme cette dernière manière de comprendre la formation de l'urée dans le foie. On prend un morceau de foie d'un chien récemment sacrifié (le foie a été débarrassé de son sang par le lavage). On enrobe ce fragment dans la paraffine.

On dose l'urée dans le foie frais, puis dans le morceau

(1) C'est une des formules proposées par M. CHAUVÉAU, *La vie et l'énergie chez l'animal*, p. 35.

(2) GAUTIER, *Chimie biologique*, p. 735.

(3) CH. RICHTER, De la formation de l'urée dans le foie après la mort. *Compt. rend. Ac. Sc.*, CXVIII, p. 1125.

de foie resté pendant quelques heures dans la paraffine. Dans ce dernier morceau, la quantité d'urée a notablement augmenté. Il y a donc eu formation d'urée sans intervention d'oxygène libre.

Du reste, l'expérience directe prouve que le tissu du foie, loin d'être oxydant, est très réducteur. Dans les expériences déjà citées d'Ehrlich, à la suite d'injections intraveineuses de bleu d'alizarine, le parenchyme du foie n'est pas teint en bleu, au contraire cet organe est peut-être celui qui décolore le plus rapidement le bleu d'alizarine. La cellule hépatique vivante est donc un élément essentiellement réducteur.

La recherche de l'oxydase hépatique n'a du reste donné que des résultats négatifs à MM. Abelous et Biarnès (1). La teinture de gaïac ne bleuit pas au contact du tissu de cet organe ; seul le réactif de Rœhmann et Spitzer donne une réaction, mais seulement au bout de deux à trois heures.

Nous avons fait aussi en décembre 1896 quelques expériences à ce sujet. On sacrifiait un chien, son foie était lavé par un courant de NaCl à 70 00 à 38° jusqu'à décoloration complète. On faisait alors une macération de ce foie lavé dans l'eau chloroformée à 38°. La liqueur filtrée ne nous a jamais donné la moindre réaction avec la teinture de gaïac, non plus que le résidu resté sur le filtre (2).

(1) ABELOUS et BIARNÈS, Sur l'existence d'un oxydase chez les mammifères. *Compt. rend. Soc. biol.*, 1897, p. 286.

(2) Dans deux expériences, le foie étant lavé, on injectait par la veine porte de l'eau chloroformée qu'on maintenait sous pression dans le foie

Nous arrivons donc à cette conclusion :

1° On comprend très bien le fonctionnement du foie sans oxydase hépatique ;

2° Les différentes expériences tentées pour mettre en évidence des phénomènes d'oxydation ou la présence d'une oxydase dans le tissu du foie sont restées négatives. (2)

Le fait que la bilirubine arrive dans la vésicule sans avoir été transformée en biliprasine ou biliverdine n'a donc plus lieu de nous surprendre.

Mais il reste à déterminer pourquoi cette transformation se fait dans la vésicule où les conditions d'oxydation paraissent si peu favorables.

Nous trouvons l'explication de ce fait dans la découverte de Rüdinger (1). Cet auteur établit dans le mémoire cité qu'il existe une diapédèse des leucocytes à travers les parois du tube digestif ; qu'en particulier cette diapédèse est très active au niveau de la vésicule biliaire ; que les leucocytes traversant en grand nombre les parois de cette vésicule viennent *se détruire dans sa cavité* et, nous ajouterons, y mettre en liberté leur oxydase qui peut alors agir sur la bilirubine pour la transformer en biliprasine et biliverdine.

en fermant la veine cave. L'eau chloroformée maintenue ainsi sous pression au contact de la cellule hépatique n'a jamais montré la moindre propriété oxydante.

(1) RÜDINGER, Ueber Leucocytenwanderung in den Schleimhäuten des Darmkanals (S. B. AK. München, 125). Analysé dans *Année biologique*, 1885, p. 437.

(2) Nous reviendrons à la fin de notre travail sur cette question qui, à notre sens, n'a pas été envisagée encore sous son vrai jour.

Ici encore nous trouvons que l'oxydase est produite par la destruction du leucocyte et nous voyons que le seul liquide de l'organisme vivant où on ait pu constater l'existence d'une oxydase active est précisément celui dans lequel un grand nombre de leucocytes viennent se détruire spontanément.

C'est là, nous semble-t-il, une nouvelle et importante confirmation du fait dont nous cherchons à établir la généralité (1).

CONCLUSION. — Dans tous les cas où nous avons constaté la présence d'une oxydase chez les animaux, nous avons pu établir qu'elle provenait de la destruction des leucocytes.

Est-ce là son unique origine? En toute rigueur, il nous est impossible de l'affirmer, mais il y a cependant de fortes probabilités pour qu'il en soit en effet ainsi.

(1) L'oxydase de la salive (beaucoup moins active du reste) a la même origine aussi. Dans le même mémoire RUDINGER décrit la diapédèse des leucocytes dans la cavité buccale à travers les amygdales.

CHAPITRE XII

Rôle physiologique des oxydases.

Les hypothèses faites sur le rôle physiologique des oxydases sont plus nombreuses que les expériences destinées à nous éclairer sur ce point important.

M. Bourquelot (1), en faisant agir simultanément sur une solution de salicine l'émulsine et une oxydase, a obtenu dans un premier temps la formation d'alcool salicylique (action de l'émulsine) et dans un second la formation d'aldéhyde salicylique (action de l'oxydase sur l'alcool salicylique).

C'est là un fait intéressant; M. Bourquelot pense qu'on doit comprendre de la même façon la formation de l'aldéhyde salicylique dans la reine des prés.

Chez les animaux, la voie des physiologistes était toute tracée, et, dès la découverte des oxydases on devait chercher à prouver que ces ferments provoquaient l'oxydation de certains principes, du glucose en particulier, et étaient par conséquent les promoteurs des actions chimiques, sources de l'énergie actuelle, sources des phénomènes de mouvement et de chaleur qui sont les caractéristiques des êtres animés.

(1) BOURQUELOT, Actions successives d'un ferment soluble hydratant et d'un ferment soluble oxydant. *Compt. rend. Soc. biol.*, 21 mars 1896, p. 313.

Ce sont surtout Rœhmann et Spitzer (1) qui ont essayé d'établir ce rôle physiologique des oxydases en s'appuyant sur les faits suivants :

1° La glycolyse se produit par un processus d'oxydation (elle cesse dans le sang privé d'oxygène et reprend dans le sang de nouveau oxygéné).

2° Il existe un parallélisme marqué entre le pouvoir glycolytique d'un tissu et son « pouvoir d'excitation de l'oxygène », autrement dit, sa teneur en ferment oxydant.

MM. Abelous et Biarnès (2), dans une de leurs dernières communications, avaient aussi annoncé leur intention de traiter cette question et devaient donner les résultats « d'expériences sur l'oxydation du glucose *in vitro* et dans l'organisme sous l'influence du ferment oxydant ».

Ces auteurs n'ayant pas encore publié leurs résultats, nous ne préjugerons pas de leur opinion à cet égard.

Les physiologistes qui se sont ainsi occupés d'identifier le ferment glycolytique et le ferment oxydant paraissent avoir complètement négligé un point de vue qui me paraît cependant de première importance, celui de savoir si ces deux ferments : oxydase et ferment glycolytique existent dans le sang circulant et les tissus vivants.

Or nous avons vu déjà qu'en ce qui concerne l'oxydase,

(1) W. SPITZER, Die zuckerstœrende Kraft des Blutes und der Gewebe. Ein Beitrag zur Lehre von der Oxydationswirkung der Gewebe. *Pflugers Archiv*, 60, 303-339 ; RœHMANN und SPITZER, Ueber Oxydationswirkungen thierischer Gewebe. *Berichte d. deuts. chem. Ges.*, 28, 567, 572.

(2) ABELOUS et BIARNÈS, Sur l'existence chez les mammifères de globulines possédant les propriétés des ferments solubles oxydants. *Compt. rend. Soc. biol.*, 1897, p. 576.

toutes nos expériences nous conduisent à nier son existence dans les liquides et les tissus de l'animal vivant (exception faite pour la bile ; qu'on peut négliger en examinant cette face de la question).

Le ferment glycolytique existe-t-il dans le sang de l'animal vivant ? Pas davantage ; les conclusions d'Arthus (1) sur ce point sont très fermes et appuyées sur des preuves convaincantes dont les principales sont les suivantes :

La glycolyse ne se produit pas dans le sang qui n'a pas quitté le vaisseau (jugulaire du cheval suspendue).

Elle est nulle dans les moments qui suivent la sortie du sang du vaisseau.

Le sang fluoré au sortir du vaisseau ne subit pas la glycolyse, il la subit si on n'ajoute le fluorure que plus tard.

Ainsi la question de savoir si l'oxydase possède un pouvoir glycolytique perd donc *a priori* considérablement de son intérêt puisque ce rôle ne serait qu'une curiosité qu'on pourrait constater *in vitro*, mais qui ne saurait expliquer en rien les oxydations dont les tissus de l'animal vivant sont le siège.

Cherchons cependant à résoudre cette question.

Certaines particularités rapprochent en effet le ferment oxydant et le ferment glycolytique ; tous deux semblent provenir de la destruction du leucocyte ; mais cette communauté d'origine n'implique pas l'identité de ces deux ferments ; car il y a d'autres ferments qui proviennent de la destruction du leucocyte, le fibrin-ferment par exemple

(1) ARTHUS, Glycolyse dans le sang et ferment glycolytique. *Archives de physiologie*, 1891, p. 726 et 1892, p. 337.

qu'on n'a jamais pensé à identifier avec le ferment oxydant.

D'ailleurs, certaines propriétés physiques paraissent différencier nettement ces deux ferments. MM. Lépine et Barral ont en effet montré qu'une température de 55° empêche définitivement la destruction du sucre du sang, et détruit par conséquent le ferment glycolytique ; nous avons vu au contraire que le ferment oxydant possède son optimum d'action à une température supérieure à 55° et n'est détruit qu'à une température bien plus élevée.

Voyons maintenant ce que donnent les expériences.

Pour ces expériences, nous ne pouvons employer l'oxydase provenant de la destruction du leucocyte, puisque, d'après les recherches des auteurs qui se sont occupés de la glycolyse, le leucocyte en se détruisant met aussi en liberté le ferment glycolytique.

Nous allons donc expérimenter sur la laccase de l'arbre à laque qui nous a été très obligeamment fournie par M. Bertrand. Cette oxydase, qui est beaucoup plus active que celle du sang des mammifères, qui, très rapidement donne des cristaux de quinhidrone, doit avoir un pouvoir glycolytique au moins égal à l'oxydase qui provient de la destruction des leucocytes.

EXPÉRIENCE 1, 8 janvier 1897. — On met dans un flacon A :

Eau distillée stérilisée.	130 cc.
Glucose pure	0 gr. 100
Solution laccase à 1 0/0	20 cc.

Dans un flacon B les mêmes substances en mêmes proportions ; mais la solution de laccase a été portée à l'ébullition.

Aussitôt que les solutions sont préparées, on y dose directement le sucre au moyen de la liqueur de Violette ferrocyanurée.

On obtient pour A le chiffre de 0 gr. 108.

— B — 0 gr. 106 (1).

On met les deux flacons à l'étuve à 40°, et au moyen d'une trompe à eau, on établit un courant d'air qui, après s'être filtré sur de l'ouate stérilisée, traverse B puis A.

Au bout de 24 heures de séjour à l'étuve, on retire les deux flacons, on les ramène exactement au volume qu'ils avaient au moment de leur mise à 40° (2) et on dose de nouveau la glucose au moyen de la même liqueur de violette ferrocyanurée. On obtient :

Pour A 0 gr. 106.

Pour B 0 gr. 107.

CONCLUSION. — Les très faibles différences obtenues tiennent à l'imperfection de la méthode et on n'est nullement en droit de conclure que l'action de la laccase a provoqué la disparition, la glycolyse de la moindre quantité de glucose (3).

EXPÉRIENCE II, *novembre 1897*. — C'est la répétition de l'expérience précédente, mais afin de pouvoir la prolonger plus longtemps, on opère en présence du fluorure de sodium à 1 0/0. Comme Arthus l'a montré, on se met ainsi à l'abri de toute intervention des microorganismes et le fluorure de sodium ne gêne guère l'action du ferment glycolytique dans les liqueurs où il existe (4).

Dans 100 centimètres cubes d'une solution de fluorure

(1) On voit donc que la laccase, tout au moins l'échantillon que nous avions en notre possession, paraît contenir une substance réductrice.

(2) Le courant d'air qui saturait d'oxygène le contenu des flacons n'étant pas saturé de vapeur d'eau avait provoqué l'évaporation de quelques centimètres cubes de liquide dans chacun des deux flacons.

(3) On constate à la fin de l'expérience que le contenu de A présente des propriétés oxydantes toujours très marquées.

(4) Par contre, il empêche la formation du ferment glycolytique dans le sang qui est fluoré au sortir du vaisseau.

de sodium à 1 0/0, on fait dissoudre 1 gramme de glucose et 1 gramme de laccase. C'est le flacon A.

Le flacon B est porté à l'ébullition après avoir été préparé comme A.

On dose le contenu des deux flacons au moyen de la liqueur de Violette ferro-cyanurée au moment où on les met à 40°, puis au bout de un, trois, huit jours de séjour à l'étuve.

Les très minimes différences obtenues tiennent comme dans l'expérience précédente aux erreurs inévitables commises dans le dosage, mais ici encore, il nous est impossible de constater une diminution appréciable de la quantité de glucose.

CONCLUSION. — Les oxydases isolées jusqu'ici, même les plus énergiques ne sont pas capables d'oxyder le glucose et de produire la glycolyse.

Il n'y a pas identité entre le ferment oxydant du sang et le ferment glycolytique.

19 décembre 1896. — Nous avons fait aussi une injection de lacase dans le système veineux d'un chien. Voici le résumé de l'expérience :

Chienne jeune de 17 kilog. Injection d'atropo-morphine. Chloroformisation.

3 h. 1/4. Température rectale 38°.

Injection dans la veine crurale de 17 centimètres cubes d'une solution de laccase à 10/0, chauffée à 38°.

3 h. température rectale 37°5.

3 h. 25 — 37°4.

3 h. 40 ————— 37°.

4 h.	—	36°8.
------	---	-------

4 h. 3: Nouvelle injection de 17 centimètres cubes de la solution de laccase.

4 h. 5 température rectale 36°7.

4 h. 20 — 36°7.

4 h. 45 — 36°5.

La baisse de température tient probablement au fait que l'animal chloroformé était attaché sur une table. On avait cependant eu soin de l'envelopper d'une couverture. Mais on voit que l'injection de laccase dans le système circulatoire a été impuissante à combattre cette baisse progressive de température.

Nous ne nous faisons du reste aucune illusion sur l'importance de cette expérience et sur les critiques auxquelles on peut la soumettre.

Nous aurions voulu la recommencer en étudiant les échanges gazeux, la production de chaleur au moyen du calorimètre; et la variation du glucose dans le sang de l'animal soumis à l'expérience; comme d'après nos expériences antérieures nous pensions arriver à un résultat négatif, nous avons conservé la petite quantité de laccase dont nous disposions encore pour des expériences que nous jugions plus intéressantes.

Quant au ferment qui, dans les expériences de Jaquet, Salkowski, Abelous et Biarnès, transformerait l'aldéhyde salicylique, il nous est difficile de savoir si on doit l'identifier avec l'oxydase ou avec le ferment glycolytique puisqu'il n'a pas été isolé.

A priori, il semble bien qu'on doive le séparer du ferment glycolytique puisque le sang fluoré à 2 0/0 *au sortir du vaisseau* continue à manifester tout aussi activement qu'auparavant ses propriétés oxydantes vis-à-vis de l'aldéhyde salicylique (Expériences d'Abelous et Biarnès).

Nous arrivons donc à cette conclusion que les ferments oxydants isolés jusqu'à présent chez les animaux ne sont pas ceux que leur rôle physiologique supposé a fait recher-

cher depuis longtemps déjà dans les tissus et liquides de l'organisme, ceux qui, présidant à l'oxydation de certains principes, du glucose en particulier, transforment l'énergie potentielle en énergie actuelle.

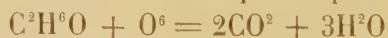
Doit-on renoncer à tout espoir d'isoler de tels ferments?

Non, sans doute, car il paraît impossible d'expliquer la production d'énergie dont l'organisme animal est le siège en invoquant seulement des phénomènes de dédoublement et d'hydratation. M. Gautier lui-même, dont nous avons exposé les idées à propos de la formation de l'urée dans le foie, pense que les phénomènes d'oxydation jouent un très grand rôle dans la vie de l'animal.

Voyons donc si nous pouvons nous expliquer pourquoi on n'a pu encore isoler les ferments dont nous parlons et comment nous avons été amenés à conclure au rôle réducteur de certains tissus alors que nous pensions y déceler des phénomènes d'oxydation.

Pour simplifier l'étude des phénomènes que nous avons en vue, considérons d'abord certains organismes unicellulaires, le *Micoderma vini* par exemple. On sait que cet organisme consomme avidement l'oxygène au moyen duquel il oxyde l'alcool et produit de l'eau et de l'acide carbonique.

L'équation suivante rend compte du phénomène :



Ici nous avons donc tout lieu de croire que nous assistons à un véritable phénomène d'oxydation. Or quel résultat obtenons-nous lorsque nous voulons déceler ce phénomène d'oxydation au moyen de nos réactifs? Toujours un résultat négatif. Si nous versons un peu de teinture de gaïac

au milieu d'une culture de *Mycoderma vini*, de *Mycoderma aceti* ou de *Saccharomyces cerevisiae*, nous n'observons pas la moindre coloration bleue. Les granules de gaïac sont au contact des cellules, accolés à leur paroi, et cependant nous n'apercevons pas la moindre oxydation de l'acide gaïaconique.

Si, au lieu de l'émulsion en laquelle se résout le réactif précédent au moment de son emploi, on se sert d'un réactif liquide qui doit pénétrer intimement la cellule on obtient toujours le même résultat. Bien plus, on constate que ces cellules possèdent un pouvoir réducteur très marqué. C'est ainsi que Nastukoff (1) a pu, en cultivant des *Saccharomyces* dans un liquide contenant du sulfate de magnésie et du sous-nitrate de bismuth, produire la réduction du sulfate en sulfure et la formation de sulfure de bismuth dont il a pu doser la quantité formée dans un temps donné.

Voici comment nous croyons devoir interpréter ces résultats : les phénomènes d'oxydation dont nous voyons les résultats (production d'énergie, excrétion de CO_2) se passent à l'intérieur de la cellule, dans la partie la plus intime de la région intraprotoplasmique. Nos réactifs ne pénètrent pas dans cette région, ils restent soit à la périphérie de la cellule, soit en dehors de la zone qui est le siège des phénomènes d'oxydation ; il n'est pas étonnant dans ces conditions qu'ils nous donnent des résultats nuls ou même contraires à ceux que nous pensions trouver, car le petit laboratoire qu'est la cellule vivante emprunte avec avi-

(1) NASTUKOFF, Essai sur le pouvoir réducteur des levûres pures. Moyen de le mesurer. *Annales Inst. Pasteur*, 1895, p. 766.

dité l'oxygène dont elle a besoin aux corps qui sont dans son voisinage immédiat, et c'est seulement lorsque cet oxygène a pénétré dans la partie la plus intime de la cellule qu'il est employé aux phénomènes d'oxydation.

La respiration élémentaire comprend donc trois phases principales :

- 1° Absorption d'oxygène ;
- 2° Phénomènes d'oxydation proprement dits ;
- 3° Rejet des produits d'oxydation CO_2 , H_2O , etc.

De ces trois phénomènes, le premier et le troisième seuls peuvent être décelés par les moyens d'investigation dont nous disposons, la constatation matérielle du second nous échappe, car, nous le répétons, nos réactifs ne pénètrent pas dans la partie de la cellule où ils se passent.

Les trois phénomènes que nous venons d'énumérer varient du reste d'intensité avec l'espèce de cellule considérée. C'est ainsi que, dans la majorité des cas, l'absorption d'oxygène ne peut s'opérer qu'aux dépens de l'oxygène libre ou dissous, on dit alors que la cellule possède la vie aérobie ; d'autres cellules possèdent la propriété de dégager l'oxygène des combinaisons dans lesquelles il est lié, elles vivent de la vie anaérobie.

En résumé, nous voyons que les résultats contradictoires et paradoxaux auxquels sont arrivés les différents auteurs qui se sont occupés du pouvoir oxydant de certaines cellules ou de certains tissus tiennent à ce fait qu'on a voulu employer pour les éléments anatomiques les réactifs employés d'habitude pour déceler le pouvoir oxydant des liquides. On a cru déceler ce qui se passait à l'intérieur du protoplasma, on a simplement constaté les phénomènes qui intervenaient à sa périphérie.

C'est, dirigé par ces idées, que nous nous étions efforcé de faire pénétrer nos réactifs à l'intérieur de la seule cellule de l'organisme qui se laisse pénétrer par nos réactifs, à l'intérieur du phagocyte. Malheureusement, nous nous sommes toujours heurtés à des phénomènes de chimiotaxie négative qui ont annulé tous nos efforts.

D'ailleurs, parviendrait-on à obtenir la phagocytose de granules de résine de gaïac ou de corps analogues sans observer leur oxydation qu'on ne serait pas encore en droit de nier les phénomènes d'oxydation dont le protoplasma est le siège. La vacuole de la cellule est en effet en dehors de cette partie intra-protoplasmique où nous croyons devoir localiser les phénomènes qui nous occupent.

C'est encore de cette façon que nous pouvons comprendre comment la bilirubine sort de la cellule hépatique sans avoir été oxydée en biliprasine et biliverdine, même s'il existe des phénomènes intenses d'oxydation à l'intérieur de la cellule hépatique. On peut en effet dans ce cas supposer avec beaucoup de vraisemblance que la bile ou tout au moins ses pigments prennent naissance dans une vacuole de la cellule (1), et par conséquent en dehors du territoire d'oxydation.

Si les ferments oxydants existent, nous entendons ceux qui sont les promoteurs des actes chimiques dynamogènes ils doivent exister précisément dans la partie de la cellule où se passent les phénomènes d'oxydation. Il n'est pas surprenant alors qu'on ne les ait pas encore isolés.

(1) Vacuole visible ou non aux plus forts grossissements.

Il semble en effet que les ferments solubles puissent être divisés en deux groupes :

1° Ceux que la cellule sécrète et rejette en dehors d'elle pour transformer la substance dont elle doit se nourrir et la rendre assimilable. L'invertine sécrétée par le *saccharomyces* est le type de ces ferments. Tous les ferments solubles du tube digestif des animaux (ptyaline, pepsine, trypsine, etc.) appartiennent-encore à ce groupe.

Ces ferments sont faciles à préparer, ils existent dans le produit de sécrétion des différentes glandes ; les cellules de ces glandes, dans leur période de repos, accumulent ces ferments (1) à leur intérieur, s'en chargent, de sorte que par des macérations appropriées on peut extraire une quantité appréciable de ces zymases.

2° Dans un deuxième groupe se placent des ferments solubles dont on suppose la présence en voyant les phénomènes qui s'accomplissent dans la cellule, mais dont il est souvent impossible de prouver l'existence. L'exemple suivant va nous permettre de nous expliquer.

Comme nous l'avons rappelé il y a un instant, le *saccharomyces* placé dans une solution de saccharose transforme ce sucre en sucre interverti ; puis produit de l'acide carbonique et de l'alcool (2) aux dépens de ce sucre interverti.

Le ferment soluble qui accomplit le premier stade de la transformation, l'invertine, peut être facilement isolé.

Mais le second stade (transformation du glucose en

(1) Ou tout au moins les proferments correspondants.

(2) Nous négligeons les produits accessoires qui importent peu pour le sujet que nous traitons.

alcool et acide carbonique) est-il produit par l'intermédiaire d'une zymase ?

Claude Bernard le pensait et il l'avait cherché, sans y parvenir, à l'isoler.

Helmoltz, Pasteur, Nægeli, à la suite de nouvelles recherches négatives, affirmaient que la décomposition du glucose en alcool et acide carbonique ne pouvait se faire que par l'intervention de la matière organisée, du protoplasma vivant et qu'aucune zymase n'était capable de produire cette transformation en dehors de la cellule.

Dans un travail très récent, H. Buchner (1) vient de montrer qu'en employant des moyens spéciaux (destruction mécanique de la cellule suivie d'une compression de 400 à 500 atmosphères) on obtenait un sac cellulaire capable à 30° de transformer instantanément le glucose en alcool et acide carbonique. Ce suc cellulaire conserve ses propriétés même lorsqu'il a traversé le filtre de porcelaine poreuse ou lorsqu'on l'additionne d'antiseptiques qui empêchent les cellules de la levure de se développer. On a donc bien affaire à une zymase ; Buchner a bien isolé le ferment alcoolique qui peut agir *in vitro* en dehors de la cellule.

C'est là, à notre sens, une très importante découverte en ce qu'elle ouvre une nouvelle voie aux physiologistes. Il est en effet permis d'espérer qu'en employant les moyens indiqués par Buchner, on pourra préparer les ferments solubles qui, comme le ferment alcoolique, restent inclus dans le protoplasma de la cellule où ils sont produits en faible quantité, selon les besoins du moment.

(1) H. BUCHNER, Die Bedeutung der activen löslichen Zellproducte für den Chemismus der Zelle. *München. med. Wochenschr.*, XLIV, 12, S. 299.

Les ferments oxydants, nous l'avons vu, sont bien dans ce cas, il semble donc que c'est dans cette voie qu'il faudra chercher pour arriver à des résultats que les moyens employés jusqu'ici n'ont pas permis d'atteindre.

Idées personnelles sur le rôle physiologique des oxydases.

Considérons d'abord les oxydases végétales. Ce sont les plus actives que l'on connaisse ; ce sont celles aussi dont on peut le mieux étudier l'action, non seulement *in vitro*, mais dans les tissus eux-mêmes, grâce à ce fait que l'oxydase est très souvent accompagnée d'un chromogène qui rend tangible l'action du ferment dès qu'elle se produit (tyrosine du dahlia, laccol de l'arbre à laque, etc.).

Or un fait que je ne trouve énoncé nulle part frappe tout d'abord lorsqu'on étudie ces phénomènes : c'est que le chromogène ne subit son changement de coloration que lorsqu'il se trouve en contact avec l'oxygène atmosphérique par suite d'une blessure de l'organe qui le renfermait.

Ainsi le laccol ne prend cette belle teinte noire que quand une incision au tronc du Rus qui le renferme lui permet de s'écouler à l'air libre ; la tyrosine du tubercule du dahlia ne se colore en noir que lorsqu'on sectionne ce tubercule ; les champignons ne se colorent en bleu ou en noir que lorsqu'ils sont brisés.

Comme les sucres de la plante doivent contenir en solution de l'oxygène, il me semble qu'on ne peut interpréter ces faits qu'en supposant que l'oxydase et le chromogène sont contenus dans des cellules différentes. Au moment où les cellules sont brisées par le traumatisme, ferment et chro-

mogène viennent au contact en même temps que l'oxygène arrive en abondance, les 3 facteurs nécessaires et suffisants pour la réaction se trouvant réunis, elle se produit instantanément.

Un second fait qui a frappé les différents expérimentateurs, M. Bertrand en particulier, c'est que l'oxydase n'existe que dans les organes *jeunes* de la plante. Les organes jeunes, dit-on, en pensant que l'oxydase intervient dans les phénomènes de nutrition beaucoup plus actifs dans ces parties du végétal, mais ne serait-il pas plus juste de dire : organes *déliçats, facilement vulnérables*. L'emploi de ces expressions implique en effet dans notre esprit une idée toute différente de l'idée de nutrition : celle de *défense de l'organisme*.

Quel est donc en effet le moyen de défense que possèdent les végétaux pour se protéger contre l'envahissement des microorganismes ? M. Metchnikoff, dans le travail que nous avons déjà cité, nous le dit (1) :

« La membrane cellulaire représente le véritable organe protecteur de la plante... La membrane des cellules végétales est trop résistante pour beaucoup de microbes, surtout pour ceux d'entre eux qui sont incapables de s'introduire activement dans l'intérieur du contenu cellulaire. »

Ce moyen de défense, le végétal l'emploie avec des variantes suivant l'organe qu'il a à protéger. A la périphérie d'un organe de soutien s'accumule une couche de cellules spécialisées qui n'ont plus qu'un rôle, celui de protection, le liège est ainsi composé.

(1) E. METCHNIKOFF, *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*, p. 48. Paris, Masson, 1892.

Mais dans d'autres points, la plante tout en conservant son unique moyen de défense, la cuirasse, est obligée d'en modifier la constitution. Ainsi, dans les organes qui contiennent de la chlorophylle, il faut que le protoplasma cellulaire, tout en étant protégé contre l'envahissement des bactéries, puisse recevoir les radiations solaires, sources de l'énergie qui permettra à l'assimilation chlorophyllienne de s'effectuer. Il ne peut plus s'agir ici d'une membrane épaisse composée d'une couche de plusieurs cellules superposées formant un revêtement opaque ; la plante épaissit seulement la paroi de la cellule qui est en contact avec le milieu extérieur, elle forme une *cuticule*. Cette cuticule est transparente, elle laisse passer facilement les radiations solaires utilisées dans l'assimilation chlorophyllienne, mais elle est fragile, exposée aux violences de toutes sortes. Dès qu'elle sera rompue en un point, les microorganismes qui sont nombreux à la surface de l'organe lésé vont s'introduire par la brèche, se développeront facilement à l'intérieur du protoplasma des cellules ouvertes et gagneront facilement de proche en proche les cellules intactes en perforant les cloisons peu résistantes qui séparent les unes des autres les différentes cellules. Ce sera l'envahissement rapide et la destruction sans lutte possible de la plante entière ou tout au moins de l'organe qui aura perdu le seul moyen de défense dont il disposait.

Les choses ne vont point ainsi ; c'est qu'en effet le végétal possède dans ces organes facilement vulnérables un moyen de réparer presque instantanément la brèche faite aux tissus. Ce moyen est constitué par l'union de l'oxydase et de son chromogène qui, réagissant l'un sur l'autre en

présence de l'oxygène atmosphérique, forment une nouvelle cuticule, un nouveau vernis protecteur qui recouvre le point lésé, et le protège contre l'envahissement des microorganismes.

Ce vernis protecteur est si résistant aux agents chimiques, si inattaquable par les bactéries que l'industrie s'en empare lorsqu'elle peut se le procurer en quantité suffisante : la laque est le meilleur exemple qu'on puisse donner à ce sujet.

Les plantes de nos pays ne fournissent pas de phénomènes aussi faciles à constater, mais ils n'en existent pas moins et peuvent être facilement observés quand on y regarde de près.

Si, en effet, on vient à couper une partie du limbe d'une feuille tendre comme la feuille des laitues, des *Sonchus* ou de la luzerne, on observe que la tranche de section ne reste pas longtemps verte, mais noircit très rapidement. C'est là un phénomène bien connu des entomologistes qui, par ce moyen, reconnaissent si l'attaque d'une feuille par un insecte date déjà de quelques heures ou de quelques jours ou au contraire est toute récente.

Il nous semble que c'est encore de la même façon qu'on doit interpréter certains effets de la gelée sur les organes aqueux et délicats de quelques plantes riches en oxydase, les feuilles du dahlia par exemple. La gelée fait éclater les cellules gorgées de liquide, lorsqu'ensuite la température s'élève, l'oxydase et le chromogène (tyrosine par exemple) viennent au contact et l'organe entier revêt cette teinte noire que nous remarquons tout à l'heure sur la tranche de la feuille coupée.

En résumé, chez la plante, l'oxydase existe toute formée dans certaines cellules des organes délicats et exposés aux violences extérieures. Le traumatisme en venant briser quelques cellules met en même temps en liberté l'oxydase qui, s'unissant à la substance qu'elle a le pouvoir d'oxyder, forme avec elle un vernis, une nouvelle cuticule qui emprisonne et immobilise les bactéries amenées par le traumatisme à la surface de la plaie, et rétablit le revêtement qui protège le végétal contre l'envahissement des microorganismes (1).

Chez les animaux, la défense de l'organisme se fait de deux manières :

1° Par des revêtements de cellules différenciées qui s'organisent en épithéliums stratifiés, qui secrètent des lames de chitine, des plaques cornées, ossifiées, des enveloppes calcaires ou siliceuses, etc. C'est la répétition avec des variantes du mode de protection purement passif que nous avons trouvé chez les plantes.

2° Par un moyen non plus passif, mais actif : la lutte du leucocyte contre les microorganismes qui ont franchi la barrière dont nous venons de parler.

Les très belles recherches de M. Metchnikoff sur la phagocytose dans la série animale, celle de ses élèves, de M. Mesnil (2) en particulier, nous ont fait connaître dans

(1) Le fait que l'oxydase existe dans certains tubercules (pomme de terre, dahlia) ne vient que confirmer la théorie que nous proposons, d'autant plus que c'est seulement à la *périphérie* de ces organes que l'oxydase existe.

(2) FÉLIX MESNIL, Sur le mode de résistance des vertèbres inférieurs aux invasions microbiennes artificielles. Paris, Thèse de la Faculté des Sciences, 1891.

de grands détails ce mode de défense de l'organisme.

N'est-il pas remarquable que nous trouvions précisément localisée dans le leucocyte, dans la cellule adaptée à la défense de l'organisme l'oxydase qui jouait chez la plante un rôle important dans les mêmes phénomènes ?

Voyons donc si, chez les animaux, nous devons encore attribuer au ferment oxydant un rôle dans la lutte de l'organisme contre les microorganismes et comment nous devons comprendre ce rôle.

a) L'oxydase intervient-elle dans le phénomène de la phagocytose ?

C'est-à-dire, y a-t-il sécrétion d'oxydase dans la vacuole du phagocyte qui contient une bactérie ? Il nous est impossible de répondre à cette question puisque nous n'avons pu faire ingérer des grains de résine de gaïac incolores à nos phagocytes.

Mais nous savons que le leucocyte n'intervient pas seulement par ses propriétés phagocytaires dans la défense de l'organisme. Bien que l'accord à ce sujet ne soit pas entièrement fait entre les bactériologistes, il est presque certain que les propriétés curatives ou préventives des sérums ne sont dues qu'à des substances mises en liberté par le leucocyte au moment de la coagulation ou postérieurement à cet acte physiologique. Or, nous avons vu que c'est précisément dans ces circonstances que l'oxydase est elle-même mise en liberté.

b) L'oxydase serait-elle capable de produire l'atténuation ou la destruction de certaines toxines ?

L'expérience suivante semble en effet indiquer qu'il peut en être ainsi :

Dans un flacon on met :

Solution de trypsine glycérinée. . . 25 cent. cubes.

Solution de ferment oxydant à 10/0. 25 » »

Fluorure de sodium. 0 gr. 50.

Ce flacon est fermé par un bouchon de caoutchouc à deux trous dans lesquels on introduit deux tubes de verre dont l'un plonge au fond du liquide tandis que l'autre est lié à une trompe à eau. Au moyen de ce dispositif très simple, le flacon étant placé à l'étuve à 40°, on fait passer un courant d'air qui barbote dans le liquide après s'être filtré sur de l'ouate stérilisée.

Après trois heures d'oxygénation continue, la solution de trypsine a son pouvoir digestif considérablement atténué. On le constate en faisant agir cette liqueur sur de petits cubes de blanc d'œuf coagulé par la chaleur. Ces cubes sont à peine attaqués après un séjour de deux mois à 40° dans la liqueur en question.

Au contraire ils sont très rapidement digérés par la solution de trypsine additionnée de son volume d'eau distillée et fluorée à 10/0.

L'atténuation de la trypsine ne se produit pas lorsqu'on la soumet pendant trois heures à une oxygénation continue à 40° en présence de la même solution d'oxydase stérilisée à l'autoclave. Cette atténuation ne se produit pas non plus par le simple contact de la trypsine et de l'oxydase même à la température de 40°, si on ne fait pas barboter un courant d'air dans le mélange.

Ce résultat peut présenter un certain intérêt si on se rappelle qu'on s'accorde à rapprocher beaucoup de toxines de ferments solubles.

Les oxydases végétales peuvent peut-être offrir un moyen rapide et pratique d'atténuer certaines toxines *in vitro*.

En est-il de même des oxydases animales, et surtout ces dernières ont-elles le pouvoir d'agir *in vitro* sur les toxines lorsqu'elles sont mises en liberté par la destruction du leucocyte? C'est très possible, mais jusqu'à présent nous n'avons eu ni le temps, ni les moyens d'expérimenter sur ce côté de la question.

c) Notre attention s'est portée au contraire sur le point de l'organisme où l'oxydase est produite physiologiquement par la destruction du leucocyte, c'est-à-dire sur le caillot sanguin.

Voyons d'abord ce qui se passe chez les invertébrés où les phénomènes ne sont pas masqués par la présence de l'hémoglobine.

Rappelons d'abord ce que nous avons constaté chez les céphalopodes et les crustacés.

Le sang battu de ces animaux fournit une petite quantité de fibrine qui est riche en oxydase qu'on peut mettre en évidence par les solutions dans les sels neutres. Or, si on laisse les flocons de fibrine obtenus par le battage quelque temps à l'air libre, on voit cette substance noircir, puis se dessécher. On constate alors qu'elle a perdu presque complètement sa faculté de se dissoudre dans les solutions de sels neutres.

Si au contraire on plonge les flocons de fibrine encore fraîche dans l'eau bouillante, elle ne noircit pas comme précédemment (1).

(1) Il est vrai qu'ici encore elle devient insoluble, mais c'est parce qu'elle est coagulée.

Ces phénomènes se présentent avec une bien plus grande netteté encore dans le sang des insectes.

Le fait avait déjà été vu par Léon Frédéricq qui s'exprime ainsi à ce sujet :

« Le sang des insectes présente un phénomène des plus intéressants, il s'y forme, au moment de la coagulation, une substance incolore *brunissant à l'air* » (1).

Une température de 50° empêche ce phénomène.

Il en est de même de l'absence d'oxygène comme on peut s'en convaincre par l'expérience suivante :

On provoque l'autotomie d'une des pattes postérieures d'un Orthoptère de grande taille, *Ephippium vicium* par exemple. Quelques gouttes d'hémolymph s'écoulent par le moignon, mais l'hémorragie cesse bientôt et au bout de quelques minutes, la surface de section du moignon se couvre d'un enduit noir.

Si au contraire on applique au moyen d'un pinceau une couche de gélatine sur la surface du moignon, on voit apparaître une teinte légèrement grisâtre, mais non plus noire comme précédemment.

Ainsi ce phénomène de coloration et d'insolubilisation de la fibrine chez les invertébrés paraît bien être sous la dépendance de l'oxydase du sang de ces animaux.

Peut-on constater un semblable phénomène chez les mammifères ?

Assurément, mais il est moins évident car il est masqué par la présence de l'hémoglobine.

Lorsqu'après avoir défibriné du sang de porc on retire

(1) LÉON FRÉDÉRICQ, *Eléments de physiologie humaine*, Paris-Gand, 1893, p. 61.

la fibrine du sérum et qu'on la laisse encore humide exposée à l'air libre pendant une demi-heure environ, cette fibrine lavée ensuite à grande eau, et complètement débarrassée de l'hémoglobine qui l'imprégnait, conserve une couleur gris-noirâtre, elle est difficilement soluble dans les solutions de sels neutres, et fournit un abondant précipité qui résiste à la dissolution. Nous avons remarqué aussi que cette fibrine fournit une notable quantité de dyspeptone dans la digestion gastrique.

Au contraire la même fibrine, immergée dans une solution de fluorure de sodium ou de chlorure du sodium aussitôt après sa formation, prend une teinte très blanche par le lavage, est facilement soluble dans les solutions de sels neutres, fournit un faible résidu insoluble et ne donne qu'une petite quantité de dyspeptone par la digestion gastrique.

Ainsi ce phénomène d'oxydation, de noircissement, d'insolubilisation de la fibrine en présence de l'oxygène atmosphérique est un fait général dans la série animale.

Un deuxième fait qui a une grande importance physiologique doit maintenant attirer notre attention.

Rappelons d'abord cette observation que nous avons faite à plusieurs reprises dans le cours de cette étude :

Les cellules phagocytaires se refusent à incorporer des granules de résine de gaïac non oxydés, de même que de très fines particules de charbon imprégnées de solution d'hydroquinone ou de gaïacol. Au contraire, lorsque ces granules de gaïac ou ces grains de charbon sont imprégnés d'une solution de laccase, ils sont très rapidement absorbés par les phagocytes.

Dans cette expérience, le ferment oxydant a donc transformé une chimiotaxie négative en chimiotaxie positive ; il était donc naturel de penser que sa chimiotaxie à l'égard du leucocyte était positive. C'est en effet ce que l'expérience prouve.

De fins tubes de verre légèrement aplatis (1) sont remplis d'une solution de laccase à 1 pour 500 et fermés à une extrémité. On introduit ces tubes entre les branchies ou dans le pied d'un mollusque acéphale (*Anodonta cygnea*). Quelques heures après, les tubes sont pleins de leucocytes qui se remplissent de granules de charbon mélangés à la solution d'oxydase.

Chez la Grenouille, on injecte dans le sac lymphatique dorsal une solution de laccase à 1 pour 200 tenant en suspension du charbon très finement pulvérisé. Une heure après, le liquide contient de nombreux leucocytes. Cinq heures plus tard, presque toutes les particules du charbon sont réunies à la partie postérieure du sac, à l'entrée des deux cœurs lymphatiques postérieurs. Si on aspire le liquide dans lequel nagent ces fines particules, on voit qu'il contient une énorme quantité de leucocytes qui, presque tous, contiennent à leur intérieur des particules de charbon. On est très frappé de la façon dont se comportent ces leucocytes. Sitôt qu'ils sont déposés sur la lame à cellule qui sert à pratiquer cet examen, on les voit émettre de très nombreux pseudopodes : ils se déforment constamment et si rapidement qu'en interrompant l'observation pendant une demi-minute, il est souvent difficile de recon-

(1) Afin de pouvoir plus facilement observer au microscope à leur intérieur.

naître le leucocyte qu'on étudiait. Ils se déplacent aussi avec une très grande rapidité. Le déplacement mesuré au moyen d'un micromètre oculaire s'est montré dans quelques cas supérieur à 3 millimètres à l'heure (1).

De ces expériences on peut conclure : Les oxydases, pour une concentration convenable, possèdent à l'égard du leucocyte une chimiotaxie positive et, de plus, ces substances paraissent exalter l'activité de ces éléments cellulaires.

Rappelons maintenant le fait découvert par M. Dastre (2). La fibrine fraîche laissée en contact avec le sang générateur y est subtilisée et disparaît dans des proportions souvent considérables (3 à 44 0/0) qui varient avec la température.

Or cette fibrine est riche en oxydase mise en liberté par la destruction du leucocyte. Lors de sa dissolution dans le sérum qui la baigne au niveau de la plaie, l'oxydase passe elle-même dans ce sérum qui devient une solution de ferment oxydant qui doit attirer un grand nombre de leucocytes des tissus et des capillaires voisins.

C'est en effet ce qui a lieu. Avec beaucoup d'autres, l'expérience suivante le prouve d'une façon démonstrative.

On provoque une hémorrhagie assez abondante dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille en coupant une artère de la région ou sectionnant la pointe du cœur d'une seconde grenouille et laissant s'écouler le sang dans le sac

(1) Ces expériences étaient faites à la température de 16°.

(2) DASTRE, Fibrinolyse dans le sang. *Archives de physiologie*, 1893, p. 661.

lymphatique de la première. Il se forme un caillot qui se moule sur les aponévroses des muscles de la région dorsale de la grenouille.

En puisant avec une pipette effilée à la face inférieure de ce caillot, on obtient un liquide opalescent extrêmement riche en leucocytes. Ces leucocytes ont bien été attirés des tissus voisins par l'oxydase du caillot qui subit la fibrinolyse, et n'ont pas émigré à travers les mailles du caillot, car ce caillot, formé sur un fragment de peau de grenouille, ne présente pas cette couche de leucocytes à sa face inférieure.

Si nous rapprochons ces faits du rôle si bien mis en évidence par M. Ranvier (1) des cellules conjonctives dans la cicatrisation des plaies, nous pouvons ainsi résumer notre façon de comprendre ce qui se passe au niveau d'une plaie qui vient de se produire.

Les leucocytes du sang qui s'écoule sont en partie détruits, ils mettent en liberté leur fibrin-ferment qui provoque la coagulation du sang et arrête l'hémorrhagie. Ils mettent en même temps en liberté leur oxydase qui teint la fibrine.

La couche de fibrine qui est en contact avec l'atmosphère s'oxyde, s'insolubilise, devient probablement moins attaquable aux bactéries et rétablit une barrière provisoire au niveau de l'épiderme lésé.

Les couches sous-jacentes de fibrine subissent la fibri-

(1) RANVIER, De l'endothélium du péritoine et des modifications qu'il subit dans l'inflammation expérimentale ; comment il faut comprendre la guérison par réunion immédiate. *Compt. rend. Ac. Sc.*, 1891, 112, p. 842.

nolyse, l'oxydase passe en solution, les leucocytes, les phagocytes arrivent en très grand nombre, les uns s'emparent des bactéries qui avaient été introduites par le traumatisme, les autres s'appliquent sur les filaments de fibrine et édifient un tissu de cicatrice d'autant plus activement que l'oxydase a exalté leur vitalité.

Ainsi est expliqué le rôle physiologique de l'oxydase en même temps que celui de la fibrinolyse.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. — Il existe chez les animaux et dans les différents groupes de la série animale des ferments solubles oxydants.

II. — Ces ferments ont les mêmes propriétés générales que les mêmes agents chimiques isolés chez les végétaux. Ils s'en distinguent cependant par une moins grande puissance d'action.

III. — Ces ferments solubles n'existent pas dans le sang ou les tissus des animaux vivants (excepté dans la bile de la vésicule et dans certaines conditions).

IV. — Ils proviennent de la destruction des leucocytes.

V. — Les oxydases jusqu'ici isolées des tissus animaux et végétaux ne sont pas capables de produire les oxydations, sources principales de l'énergie vitale.

VI. — Le rôle physiologique de ces oxydases aussi bien chez les végétaux que chez les animaux est un rôle de défense de l'organisme contre l'envahissement des microorganismes.

VII. — Il existe probablement d'autres oxydases. Elles n'ont pu être extraites de la cellule animale par les moyens employés jusqu'ici. Elles le seront peut-être par certains procédés employés récemment pour obtenir le ferment alcoolique des *saccharomyces*.

Vu :

Le Président de la thèse,
R. BLANCHARD.

Vu :

Le Doyen,
P. BROUARDEL.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
CHAPITRE I. — Introduction	5
CHAPITRE II. — Constitution chimique des oxydases.	14
CHAPITRE III. — Propriété des oxydases.	16
CHAPITRE IV. — Mode d'action des oxydases.	19
CHAPITRE V. — Séparation des oxydases des autres corps oxydants. Définition du ferment oxydant.	20
CHAPITRE VI. — Réactifs des ferments oxydants.	25
CHAPITRE VII. — Distribution des ferments oxydants dans la série animale.	28
CHAPITRE VIII. — Etude de l'oxydase du sang des mammifères	48
CHAPITRE IX. — L'oxydase est liée au leucocyte.	54
CHAPITRE X. — L'oxydase existe-t-elle dans le sang circulant ou dans les tissus de l'animal vivant	63
CHAPITRE XI. — L'oxydase des animaux provient-elle toujours de la destruction des leucocytes	75
CHAPITRE XII. — Rôle physiologique des oxydases	85
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	113

Imp. G. Saint-Aubin et Thevenot. — J. Thevenot, successeur, Saint-Dizier (Hte-Marne).
